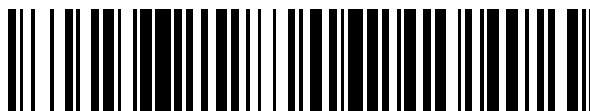


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 173**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2008** **PCT/US2008/087732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009** **WO09088713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008** **E 08869658 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2240578**

54 Título: **Furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal y métodos para producir la misma**

30 Prioridad:

31.12.2007 US 1815207 P

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

16.12.2019

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

PLAIMAUER, BARBARA;

VON FIRCKS, SIMONE;

GRILLBERGER, LEOPOLD;

HASSLACHER, MEINHARD;

GEYER, ROLAND;

MITTERER, ARTUR y

REITER, MANFRED

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 735 173 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

Furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal y métodos para producir la misma

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/018.152, presentada el 31 de diciembre de 2007.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención se refiere en general a composiciones de furina recombinante (rFurina) y a métodos para producir rFurina. Más específicamente, la invención se refiere a rFurina sustancialmente libre de proteína animal y a métodos para producir rFurina sustancialmente libre de proteína animal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 Las proteínas activas o maduras están presentes generalmente en cantidades muy bajas en los organismos vivos. Por tanto, sus pro-proteínas o pro-enzimas son preferiblemente activadas *in vitro* poniéndolas en contacto con enzimas de activación (por ejemplo proteasas). Las pro-proteínas (o precursores de proteína) son proteínas inactivas que se activan por una o más modificaciones postraduccionales y, en particular, por la escisión de un pro-péptido de la pro-proteína. Los ejemplos de pro-proteínas incluyen, por ejemplo, pro-insulina, protrombina, factor pro-von Willebrand (pro-VWF) y similares.

- 25 El factor von Willebrand (VWF) es una glicoproteína sanguínea involucrada en la coagulación. El VWF es deficiente o defectuoso en la enfermedad de von Willebrand y está involucrado en un gran número de otras enfermedades, que incluyen la púrpura trombocitopénica trombótica, el síndrome de Heyde y posiblemente el síndrome hemolítico-urémico. El VWF es una glicoproteína que circula en plasma como una serie de multímeros que varían en tamaño desde aproximadamente 500 hasta 20.000 kD. Las formas multiméricas de VWF están compuestas por subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El VWF media la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared de vaso dañado, y se cree que solo los multímeros más grandes del VWF presentan actividad hemostática. Los multímeros de VWF que tienen grandes masas moleculares se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan tras la estimulación. Entonces el VWF liberado se procesa adicionalmente por las proteasas plasmáticas para dar como resultado formas de VWF de bajo peso molecular.

- 35 En humanos, la eliminación del pro-péptido es casi completa, mientras que en líneas celulares de mamíferos con un alto nivel de expresión de VWF recombinante, este procedimiento no es muy eficaz. Por tanto, los sobrenadantes de cultivos celulares de tales líneas celulares recombinantes comprenden generalmente una mezcla de precursores de VWF y VWF maduros, como pro-VWF. Para obtener VWF maduro, es por tanto necesario convertir los precursores de VWF, en particular pro-VWF, en VWF maduro. Este procedimiento se logra generalmente mediante la escisión del pro-péptido con una proteasa.

- 40 Los métodos convencionales actuales producen VWF maduro o bien mediante la incubación de su pro-forma con proteasas en una fase líquida, mediante lo cual la propia maduración (es decir, la escisión del pro-péptido de la pro-proteína) ocurre en un estado no unido en disolución libre, o bien tal como se describe, por ejemplo, en documento WO 00/49047, mediante la inmovilización de la proteasa en un portador sólido, que se pone en contacto y se incuba con una preparación que comprende pro-VWF (véase por ejemplo el documento WO 00/49047). Sin embargo, estos métodos comprenden varias desventajas con respecto a los métodos según la presente invención.

- 50 Industrialmente, el VWF y, en particular, el VWF recombinante (rVWF) se sintetiza y se expresa junto con el factor VIII recombinante (rFVIII) en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) modificada mediante ingeniería genética. La función del rVWF coexpresado es estabilizar el rFVIII en el procedimiento de cultivo celular. El rVWF se sintetiza en la célula en la pro-forma, que contiene un pro-péptido grande unido al extremo N-terminal. Tras la maduración en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, el pro-péptido se escinde por la acción de la proteasa celular furina y la proteína madura se secreta como un homopolímero de subunidades idénticas, que consiste en dímeros de la proteína expresada. Sin embargo, la maduración es normalmente incompleta, dando lugar a un producto que comprende una mezcla de pro-VWF y VWF maduro.

- 60 Publicaciones anteriores han demostrado que el pro-VWF puede convertirse en VWF maduro mediante tratamiento *in vitro* con furina o proteasas similares a la furina (Schlokot *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 257-267, 1996; Preininger *et al.*, Cytotechnology 30: 1-15, 1999; y EP 0775750A). En particular, el documento EP 0775750A sugiere la coexpresión de furina y VWF de forma recombinante para que pueda producirse la maduración *in situ* de VWF.

- 65 La furina recombinante (rFurina) transforma el pro-rVWF (factor von Willebrand pro-recombinante) en rVWF al escindir el enlace peptídico Arg741-Ser742. Esta etapa de maduración es parte de un procedimiento de producción de rVWF para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand de tipo B y parte del procedimiento de fabricación para el factor VIII recombinante-vida media (rFVIII-HL). La furina pertenece a la familia de las pro-proteínas convertasas y depende del calcio (Ca²⁺). La furina escinde específicamente el enlace peptídico C-terminal de la

arginina dentro de una secuencia específica, que contiene arginina en las posiciones -1 y -4. Esta secuencia puede encontrarse en numerosas proteínas humanas, lo que demuestra que la furina desempeña un papel importante en la maduración de de varias pro-proteínas humanas.

La producción de proteínas activadas es de gran importancia clínica y diagnóstica. Por ejemplo, proteínas activas o maduras, como el VWF maduro, pueden usarse para controlar la coagulación de la sangre. La presente invención proporciona una furina recombinante mejorada (rFurina) que es rFurina sustancialmente libre de proteína animal para la producción posterior de proteínas activadas. Más específicamente, la presente invención proporciona rFurina sustancialmente libre de proteína animal para transformar pro-VWF en VWF maduro, ambos tal como se describe con más detalle a continuación.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona furina recombinante (rFurina), que es furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal (rFurina), y métodos para producir la misma, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Tales rFurina son sustancialmente libre de otras proteínas que normalmente pueden estar asociadas con la producción de rFurina, tal como proteínas séricas y proteínas de la célula huésped. Esta rFurina permite la producción posterior de proteínas maduras con alta actividad específica y alta pureza sin efectos secundarios asociados con la proteína contaminante en la preparación de rFurina. Más específicamente, esta rFurina permite la producción de VWF maduro con alta actividad específica y alta pureza. Por consiguiente, la memoria descriptiva proporciona métodos para la selección y adaptación de células huésped recombinantes a un medio químicamente definido, la expresión de la rFurina que se secreta en el sobrenadante de cultivo celular y la purificación de la rFurina tras la eliminación de la célula.

La rFurina sustancialmente libre de proteína animal de la invención incluye preparaciones o composiciones de rFurina que comprende proteínas de la célula huésped en una concentración que varía entre aproximadamente 0,1 y 0,6 ng o menos de proteína/unidad de actividad de furina o entre aproximadamente 2 y 11 µg o menos de proteína/ml y que carece esencialmente de proteínas contaminantes del suero en el medio de cultivo. La rFurina sustancialmente libre de proteína animal se define como que comprende el ADN de la célula huésped contaminante en una concentración de entre aproximadamente 0 y 0,4 pg o menos de ADN/unidad de actividad de furina o entre aproximadamente 0 y 24 ng o menos de ADN/ml y que carece esencialmente de proteínas contaminantes del suero en el medio de cultivo.

La invención incluye composiciones que comprenden furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal con una actividad de al menos 10000 U de furina/ml y proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 11 µg de proteína/ml. Tales composiciones también pueden comprender proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 1,0 ng de proteína/U de actividad de furina. En un aspecto, la proteína de la célula huésped es de una célula CHO.

En otro aspecto, la invención incluye composiciones que comprenden furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal con una actividad de al menos 10000 U de furina/ml y ADN de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 14 ng de ADN/ml. En un aspecto, el ADN de la célula huésped es de una célula CHO.

La invención también incluye composiciones que comprenden furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal con una actividad de furina específica de al menos aproximadamente 300 U/µg y proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 11 µg de proteína/ml. Tales composiciones también pueden comprender proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 1,0 ng de proteína/U de actividad de furina. En un aspecto, la proteína de la célula huésped es de una célula CHO.

La invención además incluye composiciones que comprenden furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal con una actividad de furina específica de al menos aproximadamente 300 U/µg y ADN de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 14 ng de ADN/ml. En un aspecto, el ADN de la célula huésped es de una célula CHO.

La invención también incluye métodos para preparar una composición que comprende furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal descrita en el presente documento. Tales métodos comprenden la etapa de adaptar las células huésped al crecimiento en un medio con concentraciones de suero cada vez más bajas hasta que todo el suero se elimine del medio, tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones. En otro aspecto, los métodos comprenden la etapa de transferir la célula huésped del crecimiento en un medio que comprende suero al crecimiento en un medio libre de suero. En un aspecto a modo de ejemplo, la célula huésped es una célula CHO.

La invención incluye métodos de uso de una composición que comprende furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal descrita en el presente documento. Tales usos comprenden la etapa de poner en contacto una pro-proteína con la composición en condiciones para la escisión de un pro-péptido de una pro-proteína para formar una proteína madura. Puede usarse la rFurina en la formación de cualquier proteína madura a partir de una pro-

proteína escindida por la furina. En un aspecto, la proteína madura es el factor von Willebrand. En otro aspecto, la proteína madura es el factor VIII. Además, la invención contempla que la rFurina de la invención es útil para el procesamiento tanto *in vitro* como *in vivo* de cualquier pro-proteína que escinde.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Una ilustración adicional de la invención se proporciona con referencia a los dibujos adjuntos, que se exponen a continuación en las figuras 1-18.

10 La figura 1 representa una construcción de la proteasa rFurina activa expresada en una realización de la invención. La construcción de rFurina se trunca en el extremo C-terminal en AA 577 para eliminar los dominios transmembrana y citosol ricos en cistina.

15 La figura 2 representa una genealogía de la generación del clon de CHO/rFurina n.º 488-3.

La figura 3 muestra una genealogía de la generación del clon de CHO/rFurina n.º 289-20.

20 La figura 4 representa una comparación de la distribución gráfica de los productores de rFurina en las poblaciones celulares de PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04. El 80,74% de las células en PMCB n.º 04 expresan rFurina; el 74,06% de las células en PMCB n.º 01 expresan rFurina.

La figura 5 muestra una "matriz de Doehlert" donde se combinaron cinco temperaturas con tres valores de pH, dando como resultado siete combinaciones de temperatura y pH.

25 La figura 6 muestra un análisis de gráfico de superficie de los datos en referencia a la productividad volumétrica. Las coordenadas de los datos en la figura 6 están marcadas como puntos. La superficie muestra la correlación asumida de los datos individuales.

30 La figura 7 muestra un gráfico de contorno que ilustra la influencia de la temperatura y del pH en la productividad volumétrica. Los puntos indican las condiciones (pH/temp.) que habían sido sometidos a prueba experimentalmente.

La figura 8 muestra un gráfico de superficie que es una ilustración tridimensional que demuestra la gran influencia de la temperatura y la escasa influencia del pH en la productividad volumétrica.

35 La figura 9 muestra un gráfico de superficie que ilustra la correlación modelada de manera tridimensional; demuestra la relación cuadrática y muestra claramente un máximo para la velocidad de crecimiento a 36,5°C.

40 La figura 10 representa un análisis de los datos en referencia a la productividad específica. Existe una correlación similar de la productividad específica con la temperatura y el pH como la observada para la productividad volumétrica.

La figura 11 muestra que al reducir la temperatura de 37°C a 35,1°C, la productividad volumétrica podría aumentarse desde aproximadamente 200 kU/l/d hasta 540 kU/l/d.

45 La figura 12 muestra la SDS-PAGE y la tinción de plata para la rFurina. Los patrones de banda de los eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU06002 y ORFU07002 se correlacionan en un alto grado; todas las muestras muestran una banda de furina prominente a aproximadamente 60 kDa. Es visible una tendencia a un peso molecular ligeramente inferior de las bandas de furina en muestras de la campaña ORFU06002 de los lotes MMC01 a MMC08 (figura 12, carriles 1-8).

50 La figura 13 muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de muestras utilizando un anticuerpo monoclonal anti-furina.

55 La figura 14 muestra los patrones de banda específicos para la rFurina a partir del enfoque isoelectrico (IEF) y la posterior inmunotransferencia de tipo Western de muestras de rFurina de la campaña ORFU06002.

La figura 15 muestra los patrones de banda específicos para la rFurina a partir del enfoque isoelectrico (IEF) y la posterior inmunotransferencia de tipo Western de muestras de rFurina de la campaña ORFU07002.

60 La figura 16 muestra los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western para la rFurina a partir del enfoque isoelectrico (IEF) y la posterior inmunotransferencia de tipo Western de muestras de rFurina de la campaña ORFU07002.

65 La figura 17 muestra la HPLC de fase inversa de furina para muestras de la campaña ORFU06002 (eluatos de Capto-MMC). Se sometieron a prueba las muestras con C4 RP-HPLC para establecer un patrón de huellas para la rFurina.

La figura 18 muestra la HPLC de fase inversa de furina para muestras de la campaña ORFU07002 (eluatos de Capto-MMC). Se sometieron a prueba las muestras con C4 RP-HPLC para establecer un patrón de huellas para la rFurina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al desarrollo y la producción de una línea de células huésped recombinantes que es capaz de crecer en medio libre de suero y secretar furina recombinante activa (rFurina) en el sobrenadante de cultivo celular. La línea de células huésped seleccionada para la transfección de un plásmido que codifica para una furina recombinante es, en un aspecto, la misma que la utilizada para la expresión del factor VIII recombinante y del VWF recombinante. La rFurina resultante se purifica entonces de modo que esté sustancialmente libre de proteína animal.

La furina, también conocida como PACE, PACE4, PC1/PC3, PC2, PC4 y PC5/PC6, pertenece al grupo de las serina proteasas de tipo subtilisina que desempeñan un papel importante en la escisión de pro-proteínas, especialmente en la síntesis secretoria (Van de Ven *et al.*, Crit. Rev. Oncogen. 4: 115-136, 1993). Las pro-proteínas se procesan de manera postraducional e intracelular a su forma madura por la proteasa endógena en el aparato de Golgi. El sitio de escisión de proteasa comprende una secuencia de reconocimiento que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Arg-X-Lys/Arg-Arg. La proteasa furina escinde específicamente las pro-proteínas después de esta secuencia de consenso (Hosaka *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 12127-12130, 1991).

Se han identificado las secuencias de ADN y de aminoácidos de la furina humana y murina, así como otras proteínas con función de proteasa de tipo subtilisina (Roebroek *et al.*, Mol. Biol. Rep. 11: 117-125, 1986; Roebroek *et al.*, EMBO J. 5: 2197-2202, 1986; Barr *et al.*, DNA Cell Biol. 10: 319-328, 1991; Van den Ouweland *et al.*, Nucleic Acid Res. 17: 7101-7102, 1989; Van den Ouweland *et al.*, Nucleic Acid Res. 18: 664, 1990; Smeekens *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265: 2997-3000; Smeekens *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 340-344, 1991; Kiefer *et al.*, DNA Cell Biol. 10: 757, 1991; Nakayama *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 5897-5900, 1992; y Hatsuzawa *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 22075-22078, 1990). El gen de furina humana codifica para una proteína que consiste en 794 aminoácidos, estando asignadas determinadas funciones a regiones características individuales: un centro catalítico, un dominio medio, una región rica en cistina, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (Van de Ven *et al.*, Crit. Rev. Oncogen. 4: 115-136, 1993). En un aspecto, el polipéptido de furina humana se establece en el número de registro de GenBank: EAX02111 (Centro Nacional de Información de Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU, Bethesda, MD). Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que cualquier proteína que tenga actividad biológica de furina, es decir, la capacidad de escindir pro-proteínas (por ejemplo, pro-VWF para producir VWF maduro) puede producirse mediante los métodos descritos en el presente documento.

La furina intacta se incorpora al sistema de membrana del aparato de Golgi en el que es funcionalmente activo (Bresnahan *et al.*, J. Cell Biol. 111: 2851-2859, 1990). Una forma truncada de la furina nativa sobreexpresada de 75-80 kD pudo detectarse en el sobrenadante celular como proteína secretada (Wise *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9378-9382, 1990). Esta furina secretada naturalmente se conoce como "furina liberada" (Vidricaire *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 195: 1011-1018, 1993) y se escinde en el extremo N-terminal de la porción transmembrana (Vey *et al.*, J. Cell Biol. 127: 1829-1842, 1994).

La furina truncada mediante ingeniería genética, en la que se ha eliminado la parte codificante de los dominios transmembrana y citoplasmático también puede expresarse y secretarse de la manera correspondiente. Se han descrito tales deleciones N-terminales para aminoácidos 714-794 (Leduc *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 14304-14308, 1992; Molloy *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 16396-16402, 1992); para aminoácidos 716-794 ("Sol-PACE") (Wasley *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 8458-8465, 1993; y Rehemtulla *et al.*, Blood 79: 2349-2355, 1992); y para aminoácidos 705-794 (Hatsuzawa *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 16094-16099, 1992). También se han descrito mutantes de furina que comprenden una delección de la región rica en cistina (Hatsuzawa *et al.*, J. Biochem. 101: 296-301, 1992; Creemers *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 21826-21834, 1993).

La actividad endoproteolítica de la furina y su selectividad por los aminoácidos básicos se determinó por primera vez en experimentos con el factor pro-von Willebrand (pro-VWF). El pro-VWF consiste en un pro-polipéptido con 741 aminoácidos y un factor von Willebrand (VWF) maduro con 2050 aminoácidos (Verweij *et al.*, EMBO J. 5: 1839-1847, 1986). La liberación de VWF maduro a partir de pro-VWF resulta de una escisión proteolítica después de Arg763. La transfección de ADNc de pro-VWF en vectores de expresión eucarióticos da como resultado la producción de cantidades equimolares de pro-VWF de 360 kD y de VWF maduro de 260 kD en el sobrenadante de cultivo celular. El VWF se procesa probablemente por furina que se produce de manera endógena para dar su forma madura en células transfectadas (Wise *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9378-9382, 1990, Van de Ven *et al.*, Mol. Biol. Rep. 14: 265-275, 1990).

Entre las pro-proteínas adicionales escindidas por furina o por enzimas de tipo subtilisina, respectivamente, se encuentra una serie de hormonas y factores de crecimiento (por ejemplo, proactivina A, factor de crecimiento de hepatocitos), proteínas plasmáticas (albúmina, factor VII, factor IX, factor X), receptores (pro-receptor de insulina),

proteínas virales (por ejemplo gp160 de VIH-1, hemaglutinina del virus de la gripe) así como proteínas bacterianas (toxina diftérica, toxina del carbunco) (Decroly *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 12240-12247, 1994; Stieneke-Grober *et al.*, EMBO J. 11: 2407-2414, 1992; Barr, Cell 66: 1-3, 1991; Wasley *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 8458-8465, 1993; Klimpel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10277-10281, 1992; Tsuneoka *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 26461-26465, 1993; Bresnahan *et al.*, J. Cell. Biol. 111: 2851-2859, 1990; Hosaka *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 12127-12130, 1991; y Vey *et al.*, J. Cell. Biol. 127: 1829-1842, 1994). La rFurina de la presente invención también se contempla para su uso en la escisión de estas pro-proteínas.

Mediante la coexpresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican para la furina intacta y una pro-proteína en cultivos de células eucariotas, se ha logrado un mayor procesamiento de las pro-proteínas *in vivo*. Esto se ha demostrado, por ejemplo, para el pro-factor IX (Wasley *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 8458-8465, 1993) y para el pro-VWF (documento WO 91/06314; Van de Ven *et al.*, Mol. Bio. Rep. 14: 265-275, 1990; y Rehemtulla *et al.*, Blood 79: 2349-2355, 1992). La presente invención contempla que la rFurina de la invención es útil tanto el procesamiento tanto *in vitro* como *in vivo* de cualquier pro-proteína que escinde.

Además de la coexpresión de la furina intacta con pro-proteínas, la furina truncada se ha expresado junto con pro-proteínas. Se ha demostrado que los mutantes de delección de furina son enzimáticamente activos cuando se coexpresan *in vivo* y secretados; la actividad enzimática de tales mutantes de delección podría detectarse, entre otros, en el procesamiento del pro-factor IX (Wasley *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 8458-8465, 1993) y del pro-VWF (Rehemtulla *et al.*, Blood 79: 2349-2355, 1992). Los experimentos de coexpresión con mutantes de delección de furina han demostrado que las partes transmembrana y citoplasmática de la proteína no son esenciales para la función catalítica (Rehemtulla *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8235-8239, 1992).

El documento WO 91/06314 divulga la expresión recombinante de furina en células procariotas y eucariotas, la preparación de proteínas de fusión de furina, mutantes de delección y fragmentos, la purificación de furina preparada de forma recombinante y el uso potencial de furina purificada para el procesamiento de pro-proteínas *in vitro* en general. El documento WO 92/09698 describe la expresión de PACE (furina), la coexpresión con precursores inactivos de proteínas, tales como, por ejemplo, pro-VWF, así como la preparación de proteínas de fusión. Stieneke-Grober *et al.* (EMBO J. 11: 2407-2414, 1992) describen la escisión *in vitro* de la proteína HA del virus de la gripe mediante furina purificada. Decroly *et al.* (J. Biol. Chem. 269:12240-12247, 1994) describen la escisión *in vitro* de la gp160 de VIH mediante furina.

En experimentos con furina acortada en el extremo C-terminal, se ha llevado a cabo con éxito *in vitro* la escisión de pro-albúmina y complemento Pro-C3 (Oda *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 1353-1361, 1992), toxina del carbunco (Klimpel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10277-10281, 1992), toxina diftérica (Tsuneoka *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 26461-26465, 1993) y pro-factor IX (Wasley *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 8458-8468, 1993, Bristol *et al.*, Biochemistry 33: 14136-14143, 1994).

La rFurina de la presente invención se contempla, por tanto, para su uso en el procesamiento *in vivo* e *in vitro* de pro-proteínas tal como se describió anteriormente. En un aspecto, la rFurina de la invención es especialmente útil en el procesamiento *in vitro* de pro-VWF y de pro-factor IX. Sin embargo, no debe interpretarse que su uso está limitado al procesamiento de dichas proteínas. En un aspecto adicional, la rFurina de la invención es particularmente útil en el procesamiento *in vitro* de pro-proteínas recombinantes.

Un aspecto adicional de la presente invención es el co-cultivo de células que expresan pro-VWF y rFurina. Por tanto, el pro-VWF en el sobrenadante de cultivo celular se escinde *in vitro* para dar su forma activa por la rFurina que también está presente en el sobrenadante de cultivo celular. El VWF procesado se aísla posteriormente del cultivo y se purifica, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.210.929. Para el co-cultivo, pueden usarse todos los sistemas de expresión comunes, y pueden combinarse entre sí varios sistemas para expresar pro-VWF y rFurina. En un aspecto, se utiliza un sistema de expresión en el que tanto el proFVW como la rFurina se expresan en células huésped del mismo origen.

El término "célula huésped" se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o que es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y expresar entonces un gen de interés seleccionado. El término incluye la progenie de la célula original, independientemente de si la progenie es idéntica en morfología o en composición genética a la célula original, siempre que el gen seleccionado esté presente.

La invención incluye cualquier célula huésped o huéspedes conocidos en la técnica para la producción de proteína recombinante. Por tanto, las células tal como se usan en la presente invención pueden derivarse de cualquier fuente. En un aspecto, la invención incluye células huésped eucariotas y procariotas. En otro aspecto, la invención incluye células de plantas, células de animales, células de peces, células de anfibios, células de aves, células de insectos y células de levadura. En un aspecto, células de levadura a modo de ejemplo incluyen *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*, y *Saccharomyces* por ejemplo *S. cerevisiae*, así como *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *K. Zactis*, *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. wickerhamii*, *K. waltii*, *K. drosophilum*, *K. thernotolerans* y *K. marxianus*; *K. yarrowia*; *Trichoderma reesia*, *Neurospora crassa*, *Schwanniomyces*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Totypocladium*, *Aspergillus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Células

de insectos a modo de ejemplo incluyen *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*, y *Drosophila*.

En un aspecto adicional, las células huésped son células de mamíferos, que incluyen células epiteliales primarias (por ejemplo, queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales y células epiteliales retinales) y líneas celulares establecidas y sus cepas (por ejemplo, células renales embrionarias 293, células BHK, células epiteliales cervicales HeLa y células retinales PER-C6, células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células CHO, células BeWo, células Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LS 180, células LS 174T, células NCI-H-548, células RPMI 2650, células SW-13, células T24, WI-28 VA13, células 2RA, células WISH, células BS-C-1, células LLC-MK₂, células clon M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-1, células LLC-PK₁, células PK(15), células GH₁, células GH₃, células L2, células LLC-RC 256, células MH₁C₁, células XC, células MDOK, células VSW, y células TH-1, B1, o derivados de las mismas), células de fibroblasto de cualquier tejido u órgano (que incluyen, pero no se limitan a, corazón, hígado, riñón, colon, intestinos, esófago, estómago, tejido nervioso (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, capilar), tejido linfático (glándula linfática, adenoides, amígdala, médula ósea y sangre), bazo, y líneas celulares de fibroblasto y de tipo fibroblasto (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células citrulinemia, células Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células MiCl₁, células CV-1, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células Vero, células DBS-FrhL-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C.sub.3H/10T1/2, células HSDM₁C₃, células KLN205, células McCoy, células Mouse L, células Strain 2071 (Mouse L), células L-M strain (Mouse L), células L-MTK (Mouse L), clones NCTC 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células de muntíaco de la India, células SIRC, células C.sub.II y células Jensen o derivados de las mismas).

Células de mamíferos a modo de ejemplo incluyen variedades de CHO, BHK, HEK-293, NS0, YB2/3, SP2/0 y células humanas tales como PER-C6 o HT1080, así como VERO, HeLa, COS, MDCK, NIH3T3, Jurkat, Saos, PC-12, HCT 116, L929, Ltk-, WI38, CV1, TM4, W138, Hep G2, MMT, una célula leucémica, una célula madre embrionaria o un óvulo fertilizado. En un aspecto de la invención, una célula huésped a modo de ejemplo es una célula CHO. En un aspecto adicional de la invención, el medio se usa para cultivar células CHO en suspensión.

Puede modificarse mediante ingeniería genética las células huésped para expresar una proteína en una variedad de formas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la inserción de ácido nucleico exógeno que codifica para la proteína deseada, opcionalmente como parte de un vector de expresión, la inserción de una secuencia de control de expresión exógena de manera que causa una mayor expresión del gen endógeno de la célula huésped que codifica para la proteína deseada, o la activación de la(s) secuencia(s) de control de expresión endógena de la célula huésped para aumentar la expresión del gen endógeno que codifica para la proteína deseada.

Los cultivos de células huésped pueden prepararse según cualquier método conocido en la técnica, y los métodos de hacer crecer tales células huésped y recuperar la proteína recombinante producida por las células, ya sea a partir de las células o del medio de cultivo, se conocen en la técnica. Tales métodos de cultivo pueden implicar la adición de químicos inductores de producción de proteínas al medio de cultivo. Células huésped y procedimientos a modo de ejemplo se describen a continuación.

Un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de furina se inserta en un vector de expresión apropiado utilizando técnicas estándar de biología molecular. En un aspecto, el ácido nucleico codifica para el polipéptido de furina humana tal como se establece en el número de registro de GenBank: EAX02111 (Centro Nacional de Información de Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU, Bethesda, MD), sin embargo el experto habitual en la técnica apreciará que cualquier proteína que tenga actividad biológica de furina, es decir, la capacidad de escindir pro-VWF para producir VWF maduro, puede producirse mediante los métodos descritos en el presente documento. En un aspecto adicional, se diseñó una rFurina completamente secretada y truncada en el extremo C-terminal mediante la delección de los nucleótidos que codifican para los aminoácidos 578 a 794 que comprenden los dominios transmembrana y citoplasmático ricos en cistina. En un aspecto todavía adicional, puede añadirse una cola de aminoácidos para ayudar en los procedimientos de purificación. En aún otro aspecto, se añadió una cola de 10 residuos de histidina tras el aminoácido 577, con o sin cuatro residuos de glicina interyacentes que sirven como un ligador flexible.

Los vectores de expresión pueden incluir opcionalmente un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de empalme donador y aceptador, una secuencia que codifica para una secuencia líder o de señal para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y/o un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se describe a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia de codificación de "etiqueta", es decir, una secuencia de oligonucleótidos localizada en el extremo 5' ó 3' de la secuencia de codificación de polipéptido de furina; la molécula

de oligonucleótido codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra “etiqueta” tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe) o myc, para los cuales existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la detección o purificación por afinidad del polipéptido de furina de la célula huésped.

Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se apreciará que el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. En un aspecto, el vector es un plásmido. En un aspecto adicional, el plásmido es un vector de clonación basado en pUC. Otros vectores que pueden usarse en la invención incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación y vectores retrovirales. Los vectores contemplados por la invención incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido, fagómido o cósmido recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión virales (por ejemplo, baculovirus); sistemas celulares de plantas transfectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o incluso sistemas celulares de animales.

Los vectores de expresión de mamíferos comprenden típicamente un origen de replicación, un promotor adecuado y también cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitios de empalme donador y aceptador, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, los sitios de origen, promotor temprano, potenciador, empalme y poliadenilación de SV40 pueden usarse para proporcionar los elementos de control de expresión requeridos. Los vectores eucariotas a modo de ejemplo incluyen pcDNA3, pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL y pVITRO3.

El ácido nucleico puede transferirse a las células huésped mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo a través de transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, microinyección de ADN, fusión celular, DEAE-dextrano, cloruro de calcio, precipitación con fosfato de calcio, bombardeo de micropartículas, infección con vectores virales, lipofección, transfección o recombinación homóloga.

El término “transformado” o “transfectado” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula huésped modificada para contener un polinucleótido exógeno, que puede integrarse en el cromosoma de la célula huésped o mantenerse como un elemento episomal. Se contempla que en determinados aspectos de los métodos proporcionados, la célula huésped se transfecta en una “etapa de transfección”. El método puede comprender múltiples etapas de transfección. Además, otros métodos conocidos en la técnica para introducir polinucleótidos exógenos en una célula huésped, que incluyen por ejemplo, electroporación y fusión celular, los cuales no son técnicamente “transformación”, se encuentran dentro de la definición del término “transformación” para los propósitos de esta descripción.

La invención también proporciona métodos para cultivar, es decir hacer crecer, células huésped en condiciones que dan como resultado la expresión de la proteína rFurina. Tales métodos incluyen la etapa de recuperación de la rFurina producida por las células huésped del medio de cultivo. En un aspecto a modo de ejemplo, las células huésped se hacen crecer en un medio libre de suero químicamente definido. Debido a que el suero es un material bioquímicamente indefinido, contiene muchos componentes que no se han identificado completamente, difiere de un lote a otro y está contaminado a menudo con microorganismos, tales como virus y micoplasmas, la presencia de suero en la producción recombinante de rFurina es indeseable. Además, la presencia de proteínas animales en suero en los medios de cultivo puede requerir largos procedimientos de purificación.

La invención proporciona por tanto un medio de cultivo bioquímicamente definido, esencialmente libre de proteína animal, para cultivar células transfectadas de forma recombinante con un gen de furina humana. Los componentes del medio son en su mayoría inorgánicos, sintéticos o recombinantes, y como tales, no se obtienen directamente de ninguna fuente animal.

El medio de cultivo celular de la presente invención puede comprender uno o más compuestos de reemplazo y puede comprender uno o más compuestos de reemplazo que pueden ser compuestos de unión a metales y/o pueden comprender uno o más complejos que comprenden uno o más compuestos de reemplazo. En algunas realizaciones, el medio puede comprender uno o más complejos, comprendiendo dicho complejo uno o más elementos de transición o sales o iones de los mismos complejados con uno o más compuestos de reemplazo que pueden ser compuestos de unión a metales. En algunas realizaciones, el medio es capaz de soportar el cultivo de células *in vitro* y permite la transfección de células cultivadas en el mismo.

Según un aspecto de la invención, un elemento de transición se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en escandio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, itrio, circonio, niobio, molibdeno, tecnecio, rubidio, rodio, paladio, plata, cadmio, lantano, hafnio, tántalo, wolframio, renio, osmio, iridio, platino, oro, mercurio y actinio, o sales o iones de los mismos, y es preferiblemente una sal de hierro. Las sales de

hierro adecuadas incluyen, pero no se limitan a, FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ o FeSO_4 , u otros compuestos que contienen iones Fe^{+++} o Fe^{++} .

Los compuestos de unión a metales en el medio incluyen cualquier macromolécula que pueda interactuar con, o unirse a, elementos de transición y facilitar su captación por las células. Tal interacción/unión puede ser de naturaleza covalente o no covalente. El compuesto de unión a metales usado en este aspecto de la invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un poliol, un derivado de hidroxipiridina, 1,3,5-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)amino-metilbenceno, ácido etilendiamin-N,N'-tetrametilenfosfónico, trisuccina, un sacárido ácido (por ejemplo, gluconato ferroso), un glicosaminoglicano, ácido dietilentriaminopentaacético, N-óxido de ácido nicotínico, ácido 2-hidroxi-nicotínico, 2,2'-bipiridina mono-, di-, o tri-sustituida, un derivado de hidroxamato (por ejemplo ácido acetohidroxámico), un derivado de aminoácido, deferoxamina, ferrioxamina, porfina básica de hierro y derivados de la misma, DOTA-lisina, una texafirina, una safirina, un ácido poliaminocarboxílico, un ácido alfa-hidroxicarboxílico, un polietilencarbamato, etil maltol, 3-hidroxi-2-piridina y IRC011. En un aspecto, el compuesto de unión a metales es un poliol tal como sorbitol o dextrano, y particularmente sorbitol. En un aspecto relacionado, el compuesto de unión a metales es un derivado de hidroxipiridina, tal como N-óxido de 2-hidroxipiridina 3-hidroxi-4-pirona, 3-hidroxipirid-2-ona, 3-hidroxipirid-2-ona, 3-hidroxipirid-4-ona, 1-hidroxipirid-2-ona, 1,2-dimetil-3-hidroxipirid-4-ona, 1-metil-3-hidroxipirid-2-ona, 3-hidroxi-2(1H)-piridinona, etil maltol o piridoxal isonicotinil hidrazona. Los compuestos de unión a metales de la presente invención también pueden unirse a cationes divalentes tales como Ca^{++} y Mg^{++} .

El medio de cultivo de la presente invención puede comprender uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en adenina, etanolamina, D-glucosa, heparina, un agente de tamponamiento, hidrocortisona, insulina, ácido linoleico, ácido lipoico, rojo de fenol, fosfoetanolamina, putrescina, piruvato de sodio, triyodotironina, timidina, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-ácido glutámico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, N-acetilcisteína, biotina, cloruro de colina, D- Ca^{++} -pantotenato, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina B12, Pluronic F68, insulina recombinante, una sal de calcio, CuSO_4 , FeSO_4 , FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, KCl, una sal de magnesio, una sal de manganeso, acetato de sodio, NaCl, NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 , una sal de selenio, una sal de silicio, una sal de molibdeno, una sal de vanadio, una sal de níquel, una sal de estaño, ZnCl_2 , ZnSO_4 u otras sales de zinc, en el que cada ingrediente se añade en una cantidad que soporta el cultivo celular *in vitro*.

En otro aspecto, el medio de cultivo de la invención puede comprender opcionalmente además uno o más aportes complementarios seleccionados del grupo que consiste en una o más citocinas, peptona de soja, uno o más péptidos de levadura y uno o más péptidos de plantas (lo más preferiblemente uno o más de arroz, aloe vera, soja, maíz, trigo, guisante, calabaza, espinaca, zanahoria, patata, batata, tapioca, aguacate, cebada, coco y/o judía verde y/o uno o más de otras plantas), por ejemplo, véase solicitud internacional n.º PCT/US97/18255, publicada como WO 98/15614.

El medio de cultivo de la presente invención también puede incluir opcionalmente uno o más agentes de tamponamiento para mantener un pH óptimo. Los agentes de tamponamiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido N-2-hidroxietil-piperazin- N'-2-etanosulfónico (HEPES), MOPS, MES, fosfato, bicarbonato y otros agentes de tamponamiento adecuados para su uso en aplicaciones de cultivo celular. Un agente de tamponamiento adecuado es aquel que proporciona capacidad de tamponamiento sin una citotoxicidad sustancial a las células cultivadas. La selección de los agentes de tamponamiento adecuados está dentro del ámbito del experto en la técnica de cultivo celular.

Los componentes de medio descritos anteriormente cuando se mezclan juntos en disolución forman un medio de cultivo completo de la presente invención. Un medio completo es adecuado para su uso en el cultivo de una variedad de células de mamíferos, tal como se describe en más detalle en el presente documento. Basándose en la información obtenida en el presente documento y en el conocimiento que poseen los expertos habituales en la técnica, un experto habitual en la técnica puede obtener formulaciones de medios operativos sin excesiva experimentación.

Inicialmente y antes de la adaptación para el crecimiento en un medio libre de suero químicamente definido, pueden cultivarse las células huésped en medios estándar bien conocidos por un experto habitual en la técnica. Los medios generalmente contendrán todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para el cultivo de células eucariotas son el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (RPMI 1640), el medio mínimo esencial (MEM) y/o el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), DMEM/F12, y el medio ExCell 325, todos los cuales pueden complementarse con suero y/o factores de crecimiento como lo indica la línea celular particular que se está cultivando. Notablemente, sin embargo, la invención proporciona que el suero en los medios se retira entonces del cultivo para obtener células huésped que pueden crecer en medio libre de suero. Por tanto, la invención proporciona medios óptimos para el cultivo de células huésped en condiciones libres de suero para una máxima producción de rFurina. En un aspecto adicional, las células se hacen crecer en medio libre de suero en cultivo en suspensión. Las recetas para los diversos medios de la invención se proporcionan en los ejemplos en el presente documento.

En un aspecto, un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas se añade como un aporte complementario a los medios. El elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula huésped dicta el compuesto que va a usarse. Pueden usarse en los métodos y composiciones de la invención marcadores seleccionables que confieren resistencia a fármacos particulares que normalmente son tóxicos para una célula de animal. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a la kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina, geneticina, neomicina, zeomicina (zeo); puromicina (PAC); blasticidina S (BlaS) y GPT. Marcadores seleccionables adicionales son conocidos en la técnica y útiles en las composiciones y métodos de la invención.

También pueden usarse en los métodos y composiciones de la invención las enzimas metabólicas que confieren supervivencia celular o inducen la muerte celular en condiciones prescritas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: dihidrofolato reductasa (DHFR); timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) y adenina fosforribosiltransferasa (APRT), que son genes que pueden usarse en células que carecen de TK, HGPRT o APRT, respectivamente. Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que un producto de rFurina de la invención se encuentre esencialmente libre de estas proteínas añadidas.

El medio puede usarse para cultivar cualquier célula huésped o huéspedes conocidos en la técnica para la producción de proteínas recombinantes. En un aspecto de la invención, una célula huésped a modo de ejemplo es una célula CHO. En un aspecto adicional de la invención, el medio se usa para cultivar células CHO en suspensión.

Cuando las células huésped secretan la proteína recombinante de interés en el medio, el medio puede recolectarse periódicamente, de modo que pueden usarse las mismas células huésped a través de varios ciclos de recolección. Puede añadirse el medio de cultivo a un procedimiento discontinuo, por ejemplo en el que el medio de cultivo se añade una vez a las células en un solo lote, o en un procedimiento de alimentación semidiscontinua en el que se añaden periódicamente pequeños lotes de medio de cultivo. Puede recolectarse el medio al final del cultivo o muchas veces durante cultivo. Los procedimientos de producción perfundidos de forma continua también se conocen en la técnica, e implican la alimentación continua de medio fresco al cultivo, mientras que el mismo volumen se extrae continuamente del reactor. Los cultivos perfundidos generalmente alcanzan densidades celulares superiores que los cultivos discontinuos, y pueden mantenerse durante semanas o meses con recolecciones repetidas. Por tanto, los cultivos de quimiostato y los cultivos de realimentación discontinua son ambos adecuados para la fabricación de rFurina, al igual que otros métodos de cultivo conocidos en la técnica.

Son conocidos en la técnica una variedad de sistemas de cultivo que incluyen matraces T, matraces centrifugador y agitador, frasco giratorio y biorreactores de tanque agitado. El cultivo en frasco giratorio se lleva a cabo generalmente sembrando las células en frascos giratorios que se encuentran parcialmente llenos (por ejemplo, a un 10-30% de su capacidad) del medio y se giran lentamente, permitiendo a las células que se adhieran a los lados de las botellas y que crezcan hasta la confluencia. Se recolecta el medio celular decantando el sobrenadante, que se reemplaza con medio fresco. También pueden cultivarse las células dependientes del anclaje en un microportador, por ejemplo, esferas poliméricas que se mantienen en suspensión en biorreactores de tanque agitado. Alternativamente, pueden hacerse crecer las células en suspensión unicelular.

La cantidad de rFurina producida por una célula huésped puede evaluarse utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturante, separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), inmunoprecipitación, ELISA y/o ensayos de actividad tales como ensayos de cambio de gel de unión al ADN. La invención también contempla que la productividad específica (expresada como cantidad de proteína/célula/día) de rFurina puede evaluarse utilizando métodos estándar tal como se conoce en la técnica y tal como se describe en el presente documento.

"rFurina sustancialmente libre de proteína animal" se define como que abarca preparaciones de rFurina que comprenden proteína de la célula huésped en una concentración que varía entre aproximadamente 0,1 y 0,6 ng o menos de proteína/unidad de actividad de furina o entre aproximadamente 2 y 11 µg o menos de proteína/ml y que carece esencialmente de proteínas contaminantes del suero en el medio de cultivo. La rFurina sustancialmente libre de proteína animal se define por las preparaciones de rFurina que comprenden el ADN de la célula huésped en una concentración que varía entre aproximadamente 0 y 0,4 pg o menos de ADN/unidad de actividad de furina o entre aproximadamente 0 y 24 ng o menos de ADN/ml y que carece esencialmente de proteínas contaminantes del suero en el medio de cultivo. En un aspecto, las células huésped que expresan rFurina se hacen crecer en un medio libre de suero químicamente definido. Alternativamente, pueden hacerse crecer las células en un medio con suero y purificarse según métodos proporcionados en el presente documento.

Las células huésped que expresan rFurina se cultivan en suspensión en un medio libre de sustancias derivadas de animales (incluyendo humanos) en condiciones de quimiostato. Las células se eliminan mediante filtración y la rFurina que contiene el sobrenadante de cultivo celular se concentra mediante ultrafiltración y se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico para dar como resultado una disolución de rFurina con una actividad de al menos aproximadamente 1000 unidades/ml, de al menos aproximadamente 2000 unidades/ml, de al menos

	aproximadamente 3000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 4000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 5000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 6000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 7000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 8000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 9000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 10000 unidades/ml, de al menos
5	aproximadamente 15000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 20000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 25000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 30000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 35000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 40000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 45000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 50000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 55000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 60000 unidades/ml, de al menos
10	aproximadamente 65000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 70000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 75000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 80000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 85000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 90000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 95000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 100000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 120000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 140000 unidades/ml, de al menos
15	aproximadamente 160000 unidades/ml, de al menos	aproximadamente 180000 unidades/ml, de al menos
	aproximadamente 200000 unidades/ml, y de al menos	aproximadamente 500000 unidades/ml y hasta más de 500000 U/ml.

20	La disolución purificada de furina recombinante de la invención tiene un actividad específica de al menos	
	aproximadamente 300 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 350 U/μg de proteína, al menos
	aproximadamente 400 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 450 U/μg de proteína, al menos
	aproximadamente 500 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 550 U/μg de proteína, al menos
	aproximadamente 600 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 650 U/μg de proteína, al menos
	aproximadamente 700 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 750 U/μg de proteína, al menos
25	aproximadamente 800 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 850 U/μg de proteína, al menos
	aproximadamente 900 U/μg de proteína, al menos	aproximadamente 950 U/μg de proteína y al menos
	aproximadamente 1000 U/μg de proteína.	

30	En otra realización, la disolución purificada de rFurina en la invención contiene proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 20,0 μg/ml, menos de aproximadamente 19,0 μg/ml, menos de aproximadamente 18,0 μg/ml, menos de aproximadamente 17,0 μg/ml, menos de aproximadamente 16,0 μg/ml, menos de aproximadamente 15,0 μg/ml, menos de aproximadamente 14,0 μg/ml, menos de aproximadamente 13,0 μg/ml, menos de aproximadamente 12,0 μg/ml, menos de aproximadamente 11,0 μg/ml, menos de aproximadamente 10,5 μg/ml, menos de aproximadamente 10,0 μg/ml, menos de aproximadamente 9,5 μg/ml,	
35	menos de aproximadamente 9,0 μg/ml, menos de aproximadamente 8,5 μg/ml, menos de aproximadamente 8,0 μg/ml, menos de aproximadamente 7,5 μg/ml, menos de aproximadamente 7,0 μg/ml, menos de aproximadamente 6,5 μg/ml, menos de aproximadamente 6,0 μg/ml, menos de aproximadamente 5,5 μg/ml, menos de aproximadamente 5,0 μg/ml, menos de aproximadamente 4,5 μg/ml, menos de aproximadamente 4,0 μg/ml, menos de aproximadamente 3,5 μg/ml, menos de aproximadamente 3,0 μg/ml,	
40	menos de aproximadamente 2,5 μg/ml, menos de aproximadamente 2,0 μg/ml, menos de aproximadamente 1,5 μg/ml, menos de aproximadamente 1,0 μg/ml, menos de aproximadamente 0,5 μg/ml, menos de aproximadamente 0,4 μg/ml, menos de aproximadamente 0,3 μg/ml, menos de aproximadamente 0,2 μg/ml, menos de aproximadamente 0,1 μg/ml y aproximadamente 0 μg/ml.	

45	En otro aspecto, la disolución purificada de rFurina en la invención contiene proteína de la célula huésped a una concentración de menos de aproximadamente 1,0 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,95 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,90 ng de proteína/U de rFurina, menos de 0,85 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,80 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,75 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,70 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,65 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,60 ng de proteína/U de rFurina,	
50	menos de aproximadamente 0,55 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,50 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,45 ng de proteína/U de rFurina, menos de 0,40 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,35 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,30 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,25 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,20 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,15 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,10 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,05 ng de proteína/U de rFurina,	
55	menos de aproximadamente 0,04 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,03 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,02 ng de proteína/U de rFurina, menos de aproximadamente 0,01 ng de proteína/U de rFurina y aproximadamente 0 ng de proteína/U de rFurina.	

60	Los ejemplos a continuación en el presente documento demuestran la invención usando células huésped CHO para producir rFurina, sin embargo, el experto habitual en la técnica se dará cuenta que cualquier tipo de célula huésped puede adaptarse de manera similar para producir la rFurina de la invención. Las células CHO se han utilizado ampliamente en la producción de proteínas recombinantes, y las células CHO modificadas mediante ingeniería genética (aquellas en las que una línea celular CHO se transfecta con un gen de producto y un gen marcador seleccionable) se cultivan rutinariamente en un medio de cultivo que contiene suero. Sin embargo, el uso de suero	
65		

supone varios problemas. El suero es un producto costoso, que no está fácilmente disponible en cantidades necesarias para la producción comercial. El suero también es un material bioquímicamente indefinido, y contiene muchos componentes que ni se han identificado completamente ni se han determinado sus acciones. Por tanto, el suero diferirá de un lote a otro, requiriendo posiblemente pruebas para determinar los niveles de los diversos componentes y su efecto en las células.

Además, el suero está contaminado a menudo con microorganismos tales como virus y micoplasmas, muchos de los cuales pueden ser inofensivos, pero aún representan un factor desconocido adicional. Además, la presencia de proteína animal en medios de cultivo puede requerir largos procedimientos de purificación. En particular, la presencia de anticuerpos bovinos en albúmina de suero bovino (BSA) hace que la purificación de los anticuerpos deseados expresados por la línea celular CHO recombinante sea extremadamente difícil. La eliminación del anticuerpo bovino del medio antes de su uso es posible, pero esta eliminación y las pruebas adicionales del producto requeridas tras la eliminación aumentan considerablemente el coste de producción del producto. En consecuencia, el uso de un medio de cultivo carente de componentes de animal que soportará el crecimiento celular, especialmente de células CHO, conlleva sus beneficios. Mientras que las células CHO no crecen fácilmente en condiciones libres de suero, la presente invención proporciona rFurina que se hace crecer en células CHO en condiciones libres de suero.

Las células CHO modificadas mediante ingeniería genética también son difíciles de cultivar en suspensión. Es altamente deseable lograr el crecimiento en suspensión cuando se usan células para expresar un producto como rFurina. Para la producción de proteína biológica de este tipo a escala comercial, es deseable poder soportar el crecimiento en fermentadores de un tamaño considerable. Se requiere también un medio adecuado para soportar las células de forma que puedan crecer en condiciones de gran producción. Tales medios adecuados se exponen en los ejemplos en el presente documento. El experto habitual en la técnica apreciará que puede usarse cualquier método para cultivar células en la técnica para cultivar las células huésped que comprenden rFurina tal como se expone en la invención. Los ejemplos no limitativos de métodos de cultivo se proporcionan en los ejemplos en el presente documento.

La invención también proporciona métodos de purificación que se llevan a cabo después de que se hagan crecer las células en medio libre de suero para eliminar las proteínas de las células CHO de la rFurina. El experto habitual en la técnica apreciará que puede usarse cualquier método de purificación de proteínas conocido en la técnica en la purificación de rFurina del medio de cultivo. Los ejemplos no limitativos de métodos de purificación se proporcionan en los ejemplos en el presente documento. Por consiguiente, puede producirse rFurina que es de manera esencial sustancialmente libre de toda proteína de fuente animal. La rFurina sustancialmente libre de proteína animal se almacena congelada opcionalmente hasta su uso.

Ejemplos

Los aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos en lugar de limitativos. El ejemplo 1 describe la construcción de un plásmido de expresión de rFurina y la transfección de la célula huésped; el ejemplo 2 describe los procedimientos de adaptación de los clones de células CHO que expresan rFurina al crecimiento en condiciones libres de suero; el ejemplo 3 describe un procedimiento de optimización para la fabricación de rFurina en medio libre de proteína animal; el ejemplo 4 describe la purificación de rFurina; el ejemplo 5 establece el procesamiento (concentración y purificación) y el análisis posteriores de la producción a gran escala de rFurina; y el ejemplo 6 demuestra las pruebas de seguridad, esterilidad y estabilidad que se realizan para determinar y mantener la calidad del banco de células huésped.

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DE FURINA RECOMBINANTE Y TRANSFECCIÓN DE LA CÉLULA HUÉSPED

En la tabla 1 se expone una descripción detallada de plásmidos progenitores de furina usados para construir un plásmido de expresión de rFurina designado con el n.º 556. Expresado bajo control de un promotor de citomegalovirus constitutivo (CMV), la rFurina madura contiene el dominio catalítico, el dominio P, y una pequeña porción del dominio rico en cistina mientras que las regiones ubicadas en el extremo C-terminal hasta el aminoácido 577 se eliminan, dando lugar a una proteasa activa completamente secretada.

se representa en la tabla 2 una descripción de la construcción del vector DHFR usado como el plásmido de selección. Para el desarrollo de clones celulares CHO/rFurina que expresan de forma estable designados como n.º 488-3 y n.º 289-20, las células CHO que carecen de un gen DHFR endógeno funcional se cotransfectaron con plásmidos n.º 556 y n.º 73 empleando coprecipitación con fosfato de calcio. Los clones que secretan altos niveles de rFurina se seleccionaron en diversas rondas de subclonación y amplificación utilizando el sistema de selección DHFR/MTX.

Tabla 1. Descripción de la generación de plásmidos de furina

Plásmido	Descripción	Comentarios
n.º 177	Plásmido original obtenido de Wim J.J. van de Ven (Universidad de Leuven, Bélgica). Un plásmido basado en pUC18 que contiene el fragmento de <i>EcoRI</i> de 4,0 kpb del ADNc de furina humana (2,385 kpb) con secuencias adicionales de regiones no traducidas 5' y 3' (UTR).	Llevado a cabo en la Universidad de Leuven, Bélgica
n.º 180	Vector de expresión de furina humana de longitud completa.	El fragmento de <i>SmaI/AvrII</i> de 2,8 kpb del plásmido n.º 177 que comprende el ADNc de furina completo (2,385 kpb) y además ~50 pb de la 5'-UTR y ~400 pb de la 3'-UTR, se clonó en el vector de expresión n.º 55
n.º 55	Plásmido de expresión eucariótico de Clontech (Palo Alto, CA, EEUU) que ha sido modificado para que contenga un sitio de clonación múltiple en lugar de ADNc de β -galactosidasa. El plásmido proporciona un promotor y potenciador de gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE), las señales de empalme de ARN del genoma de SV40 que consiste en las secuencias de empalme de donador y aceptador del gen 16s/19s de la proteína viral tardía y la señal de poliadenilación de SV40. El vector original pCMV β es un derivado de pUC19 que contiene el ADNc de β -galactosidasa de <i>E. coli</i> de ~3,4 kpb insertado en el sitio <i>NotI</i> .	Se eliminó el casete de <i>NotI</i> de β -galactosidasa y se insertó en su lugar un sitio de clonación múltiple que tiene también, entre otros sitios de restricción, sitios únicos para <i>SmaI</i> y <i>AvrII</i> .
n.º 229	Furina humana que carece de secuencias de extremo C-terminal desde la posición 578 hasta la 794, abarcando las regiones ricas en cisteína, transmembrana y citoplasmática. Tras la glicina 577, se introdujeron 4 glicinas adicionales como "espaciadores" y 10 residuos de histidina.	Entre los sitios <i>SauI</i> y <i>AvrII</i> , se insertó un ligador recocido de oligodesoxinucleótidos apropiado que codifica para 4 glicinas, 10 histidinas seguidas de un codón de terminación.
n.º 378	Derivado del plásmido n.º 229. Furina truncada después de la glicina 577 que contiene 10 histidinas pero sin las 4 glicinas.	Se eliminaron mediante PCR las 12 pb que codifican para 4 glicinas en el fragmento de <i>SauI/Hind III</i> . Luego el fragmento modificado se religó en el esqueleto del plásmido.
n.º 556	Derivado del plásmido n.º 378. Furina truncada después de la glicina 577, la cual está desprovista de secuencias heterólogas adicionales.	Eliminación mediante PCR de las 30 pb que codifican para los 10 residuos de histidina. El fragmento de <i>SauI/Hind III</i> se religó en el esqueleto del plásmido.

5 Tabla 2. Descripción de la generación de plásmidos DHFR

Plásmido	Descripción	Comentarios
n.º 29	El plásmido original denominado pAdD26SV(A)-3 se obtuvo de H.J. Hauser (GBF, Braunschweig, Alemania). Este plásmido contiene el ADNc de dihidrofolato reductasa (DHFR) murina de longitud completa detrás de un promotor tardío principal de adenovirus	Construido fuera de Baxter.
n.º 73	El ADNc de DHFR murina bajo control del promotor temprano de SV40.	Se clonaron en el sitio <i>PstI</i> del plásmido n.º 53 el fragmento <i>PstI</i> que comprende el ADNc de DHFR y la señal de poliadenilación de SV40 del plásmido n.º 29. Gracias a la estrategia de clonación, el plásmido n.º 73 contiene dos señales de poliadenilación.

n.º 53	Vector de expresión eucariótico de Clontech (Palo Alto, CA, EEUU) que ha sido modificado para que contenga un sitio de clonación múltiple en lugar de ADNc de β -galactosidasa. El plásmido proporciona un protomorf y potenciador de gen temprano de virus de simio 40 (SV40), las señales de empalme de ARN del genoma de SV40 que consiste en las secuencias de empalme de donador y aceptador del gen 16s/19s de la proteína viral tardía y la señal de poliadenilación de SV40. El vector original pSV40 β es un derivado de pUC19 que contiene el ADNc de β -galactosidasa de <i>E. coli</i> de ~3,4 kpb insertado en el sitio <i>NotI</i> .	Se eliminó el casete de <i>NotI</i> de β -galactosidasa y se insertó en su lugar un sitio de clonación múltiple que tiene también, entre otros sitios de restricción, un sitio único para <i>PstI</i> .
--------	--	---

Las células CHO transfectadas se hicieron crecer en un medio con DHFR compuesto por DMEM NUT MIX F12 (1:1) sin hipoxantina, timidina y glicina complementado con Hepes, L-glutamina, penicilina-estreptomicina, y con 5% ó 10% de SBF dializado y irradiado por rayos gamma (= 5% de DHFR, 10% de DHFR). El SBF dializado y irradiado por rayos gamma se adquirió de Life Technologies con una completa documentación de certificados de análisis, origen e irradiación. La preparación de la disolución de gamma-tripsina (1 mg/ml) se realizó en Baxter in Orth, Austria, por el departamento de preparación de medios/PCC.

Se representa en la figura 2 una genealogía de la generación del clon de CHO/rFurina n.º 488-3. El clon de CHO/rFurina n.º 488-3 se obtuvo a partir de clones iniciales que se sometieron a dos rondas de subclonación en el medio de selección de 10% de DHFR antes de entrar a amplificación en medio de selección complementado con 100 nM MTX en el que se realizó una ronda de subclonación en medio que contiene concentración de MTX sin alterar. El clon n.º 488-3 se expandió para su congelación. El clon de CHO/rFurina n.º 289-20 se preparó y se expandió del mismo modo. Sin embargo, el clon n.º 289-20 es un clon sucesor derivado del clon n.º 488-3. Se representa en la figura 3 una genealogía de la generación del clon de CHO/rFurina n.º 289-20.

La actividad de furina se midió en el medio acondicionado de los clones, los cuales se cultivaron durante 24 horas en medio con DHFR libre de suero. Se seleccionaron los clones celulares que mostraron alta actividad de furina (U/10⁶ células por 24 horas). Se expandieron los clones de alta producción seleccionados para la preparación de ampollas de stock congeladas, y se usaron para la división de la siguiente ronda de clonación. Se llevó a cabo el aislamiento y la identificación de los clones celulares de alta producción. Se analizaron las densidades celulares utilizando el contador de células Casy. Se lograron niveles de expresión de furina de hasta 200-300 U/10⁶ células por 24 horas para el clon n.º 488-3. Se lograron niveles de expresión de furina de hasta 400 U/10⁶ células por 24 horas para el clon n.º 289-20.

EJEMPLO 2: ADAPTACIÓN DE LA FURINA RECOMBINANTE QUE EXPRESA CLONES CELULARES PARA SU CRECIMIENTO EN CONDICIONES LIBRES DE SUERO

La estrategia para la adaptación y selección de líneas celulares es adaptar la línea celular a una línea celular libre de suero y proteínas o bien de manera gradual mediante dilución progresiva o bien de manera abrupta. El propósito de este estudio fue encontrar una población de células CHO que crecieran en condiciones libres de suero, las cuales produjeran rFurina de forma estable. El clon de célula CHO n.º 488-3 se usó como material de partida. El clon de célula CHO n.º 488-3 que expresa rFurina se cambió a condiciones libres de suero en tres adaptaciones realizadas de forma paralela tal como se expone en detalle a continuación.

El procedimiento de agotamiento de suero comenzó en frascos centrifugadores con el uso de microportadores para encontrar un medio para retener las células en la fase de adaptación, ya que en esa fase las células normalmente muestran un crecimiento lento. Mediante el uso de este método, fue posible evitar, durante los cambios de medio posteriores, la dilución de las células a tales concentraciones en las que el crecimiento podría ser inhibido.

Se usaron tres variantes de un medio desarrollado interno, BAP, BAS y BCS, (tal como se muestra en la Tabla 3) durante el transcurso de este estudio.

Tabla 3. Formulaciones de medio interno de BAP, BAS y BCS

Componentes	JDE N.º de artículo	Concentración [g/kg]	BAP	BAS	BCS
DMEM/F12	0200437	11,745	X	X	X
L-glutamina	0200444	0,600	X	X	X ¹
Sal sódica de rojo de fenol	0200425	0,008	X	X	X
Dihidrocloreuro de putrescina	0200233	0,0036	---	---	X
Sulfato de hierro(II) heptahidratado	0200231	0,0006	---	---	X
Etanolamina	0200426	0,00153	X	X	X
Synperonic F68	0200172	0,250	X	X	X ²
Peptona de soja	0200171	2,50	X	---	---
Bicarbonato de sodio	0301012	2,00	X	X	X
WFI (agua para inyección)	F124	ad 1 kg	X	X	X

¹ Concentración de L-glutamina en BCS: 0,900 g/kg

² Concentración de Synperonic F68 en BCS: 1,00 g/kg

Dependiendo del propósito del experimento respectivo, estas variantes de medio se proporcionaron con diferentes aportes complementarios, tal como se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4. Medios y sus aportes complementarios

	Put ¹ (mg/l)	Glut ² (mg/l)	Synp ³ (mg/l)	Fe ⁴ (mg/l)	Zn ⁵ (mg/l)
ExCell 325PF CHO	---	600	---	---	1,0 ó 5,0
BAS	3,6	300	750	0,6	5,0
BCS	---	---	---	---	1,0 ó 5,0

¹ Dihidrocloreuro de putrescina

² L-glutamina

³ Synperonic F68

⁴ Sulfato de hierro(II) heptahidratado

⁵ Sulfato de zinc(II) heptahidratado

Las siguientes tablas ofrecen una visión general de medios y reactivos, los cuales se usaron en el transcurso de este estudio. La tabla 5 resume los medios y reactivos que se usaron para el establecimiento de los clones de banco de células pre-maestro PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04.

Tabla 5. Medios y reactivos usados para el establecimiento de PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04

	Descripción	Número de lote
MEDIOS	Medio con 10% de DHFR	n.º 061005/09
	BAP+5% de SBF	M/MAB-05/009, M/MAB-05/013
	BAS+Put+Glut+Synp+Fe+5% de SBF	M/MAB-06/019 ⁴
	BAS+Put+Glut+Synp+Fe	M/MAB-06/012 ¹ , M/MAB-06/017, M/MAB-06/031, M/MAB-06/036, M/MAB-06/044, M/MAB-06/048 ⁴ , M/MAB-06/058 ⁴ , M/MAB-06/061 ⁴
	BAS+Put+Glut+Synp+Fe+Zn	M/MAB-06/063, M/MAB-06/069, M/MAB-06/072, M/MAB-06/074 ⁴ , M/MAB-06/076 ⁴ , M/MAB-06/079 ⁴
	BCS+Zn	M/CLD-06/001
REACTIVOS	Disolución de gamma-tripsina 1 mg/ml	GT_04002_1
	Tampón N1 pH 7,3	N1_05001_2
	Dimetilsulfóxido (Baxter Mat.n.º : 330000000001/JDE 0200407)	219102
	Portador Cytopore 2	Cyt2_24_06_001 ¹
	Disolución de Na ₂ HCO ₃	R/CBL/05/005 ¹

¹ solo aplicado a PMCB n.º 01

⁴ solo aplicado a PMCB n.º 04

La tabla 6 resume los medios y reactivos que se usaron en el transcurso de subclonación y establecimiento de los correspondientes bancos de células de evaluación (ECB) de los subclones n.º 488-3/CJ06-19/5F10 (5F10) y n.º 488-3/CJ06-19/1E8 (1E8).

5 Tabla 6. Números de lote de medios y reactivos usados para el establecimiento de subclones 5F10 y 1E8

	Descripción	Número de lote
MEDIOS	Medio con 10% de DHFR	n.º 061005/09
	BAP+5% de SBF	M/MAB-05/009, M/MAB-05/013
	ExCell+5% de SBF+Glut	M/MAB-05/017
	ExCell+Glut	M/MAB-05/016, M/MAB-05/022, M/MAB-06/025, M/MAB-06/035, M/MAB-06/054, M/MAB-06/057, M/MAB-06/060
	ExCell+Glut+Zn	M/MAB-06/067, M/MAB-06/071, M/MAB-06/104, M/MAB-06/142
	ExCell+Glut/BAS+Put+Glut+Synp+Fe (1:1)	M/MAB-06/062
	ExCell+Glut/BAS+Put+Glut+Synp+Fe+Zn (1:1)	M/MAB-06/070
	ExCell+Glut/BCS (1:1)	M/MAB-06/077
	ExCell+BCS+Glut+Zn	M/MAB-06/090, M/MAB-06/103, M/MAB-06/106
	BCS+Zn	M/MAB-06/105, M/MAB-06/110, M/MAB-06/116, M/MAB-06/143, M/MAB-06/129, M/MAB-06/149
REACTIVOS	Disolución de gamma-tripsina 1 mg/ml	GT_04002_1
	Disolución de inhibidor de tripsina 1 mg/ml	TI_04001_1
	Tampón N1 pH 7,3	N1_05001_2
	Dimetilsulfóxido (Baxter Mat.n.º : 330000000001/JDE 0200407)	219102
	Disolución de Na ₂ HCO ₃	R/CBL/05005

Los números de lote de todos los aportes complementarios que se añadieron a los medios se referencian en el protocolo de fabricación apropiado del medio correspondiente. Otros aditivos de medios se enumeran en la tabla 7.

10

Tabla 7. Otros aditivos de medios

Descripción	Fabricante	N.º de catálogo	N.º de lote	Proporcionado por
Aqua Bidest	Fresenius	B230673	SBV 093	Fabricante
Aqua Bidest	Fresenius	B230673	TDV 252	Fabricante
Aqua Bidest	Fresenius	B230673	TKV 261	Fabricante
Aqua Bidest	Fresenius	B230673	UCV 282	Fabricante
Portador Cytopore 2	Pharmacia Biotech	17-1271-03	249933	Planta Piloto II
DMEM NUT MIX F12 ²	Gibco	041-90163M	3097428	Líneas celulares recombinantes
ExCell 325PF CHO	JRH	14340	4N0597	Fabricante
ExCell 325PF CHO	JRH	14340	5L0191	Fabricante
ExCell 325PF CHO	SAFC Biosciences	14340C	5M0775	Fabricante
SBF ^{1,2}	Gibco	10603-017	3092829A	Líneas celulares recombinantes
SBF ¹	JRH	12303	1A0348	Fabricante
Glutamina ²	Gibco	25030-024	3096452	Líneas celulares recombinantes
Glutamina	Sigma	G-5763	117 H 00655	Fabricante
Hepes-Puffer ²	Gibco	15630-056	3094125	Líneas celulares recombinantes
Paraformaldehído	Sigma	P-6148	043 K 0653	Fabricante
Paraformaldehído	Sigma	P-6148	045 K 0703	Fabricante
Paraformaldehído	Sigma	P-6148	118 H 0987	Fabricante
Penic./estreptomicina ²	Gibco	15140-122	1276184	Líneas celulares recombinantes
Putrescina	Sigma	P5780	22 K 2615	Fabricante
Synperonic F68	Serva	35724	01137	Fabricante

¹ materiales derivados de animal: para certificados referirse al apéndice

² ingredientes de "medio con 10% de DHFR", solo usados al principio del experimento SF05-80

15

La adaptación a las condiciones libres de suero se realizó en matraces T o en frascos centrifugadores conjuntamente con retención celular (centrifugación y similar) retirando el suero fetal bovino (SBF) de las células.

Los cultivos en suspensión en matraces T se incubaron a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ y $7,5 \pm 1,0\%$ de CO_2 . El cultivo en frascos centrifugadores se llevó a cabo en frascos centrifugadores Techne y Bellco sin portadores que funcionan a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ con 80 rpm y 130 rpm, respectivamente.

5 La subclonación del clon de célula CHO/rFurina n.º 488-3, después de su adaptación a las condiciones de medio libre de suero, dio como resultado un clon de células CHO, que crecieron en suspensión en medio interno libre de suero, produciendo de forma estable rFurina en una gran cantidad. El procedimiento se basó en un método de dilución limitada. Brevemente, la suspensión celular se diluyó de forma que 100 μl de la suspensión contienen una célula. Los pocillos de una placa de 96 pocillos se llenaron con 100 μl de esta suspensión. En teoría, cada pocillo
10 contiene una célula para el desarrollo clonal. A medida que estas células individuales empiezan a crecer, los clones se desarrollan. Por tanto, puede realizarse un seguimiento de cada célula nuevamente generada hasta la primera célula original en el pocillo. Se expandieron los clones en placas de 24 pocillos, luego en matraces T25, luego en matraces T75 y luego en matraces T175.

15 Durante el cultivo, se llevaron a cabo controles en proceso (IPC) para monitorizar las condiciones de crecimiento y medir la expresión de rFurina. Las densidades celulares durante el cultivo se midieron utilizando el instrumento Casy. El instrumento contador Nucleo se aplicó para la detección de núcleos celulares tras la extracción CTX. La determinación de la densidad y viabilidad celulares tras la descongelación se llevó a cabo con método de exclusión de azul tripán utilizando un hemacitómetro. La densidad y viabilidad celulares se analizaron también utilizando un
20 método de exclusión de azul tripán automatizado realizado mediante el instrumento Cedex.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares se usaron para determinar la cantidad y la actividad de rFurina expresada. El análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) se usó para ver la proporción de células productoras y células no productoras en una población celular dada. La morfología y el comportamiento de
25 crecimiento de las células se determinaron mediante control óptico. Además, el sobrenadante de los cultivos celulares también se examinó para monitorizar las condiciones del medio, tales como la determinación del valor de pH y la concentración residual de glucosa, glutamina, lactato y amonio. Estos análisis se llevaron a cabo mediante un instrumento NOVA.

30 En el transcurso de este estudio, se produjeron dos bancos de células pre-maestros (PMCB), PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04, y se establecieron dos líneas de clones celulares tal como se expone a continuación. También se generaron los bancos de células de evaluación (ECB) (véase la tabla 15).

Preparación y pruebas de control de calidad de PMCB n.º 01

35 Se descongeló un vial de CHO/rFurina n.º 488-3 (ECB n.º 01) en el medio BAS que contenía aditivos (Put, Glut, Synp y Fe) y 5% de SBF. Se cultivaron las células durante cinco días en un T175. Luego, las células se adaptaron a condiciones libres de suero tal como se expone a continuación.

40 Las células se prepararon en 150 ml de medio de crecimiento (BAS con Put, Glut, Synp y Fe) que contenía 0,2 g/l de 5% de SBF. Se usaron portadores Cytopore 2 para la adaptación a las condiciones libres de suero. Habiendo inoculado la suspensión celular de 5 días que resulta en una densidad celular de partida de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml, las células se unieron a los portadores porosos dentro de las primeras horas. Por tanto, las células se mantuvieron en frasco centrifugador, mientras que se cambió el medio de crecimiento para reducir la concentración
45 de suero en dos etapas, desde el 5% hasta el 3,8% hasta el 0% en el día 5. Durante el siguiente periodo de cultivo, las células se adaptaron a las condiciones de medio libre de suero. Las células se desprendieron de la superficie de los portadores y continuaron su crecimiento en suspensión. La densidad celular y la viabilidad de las células en suspensión aumentaron de forma continua. Cada dos o tres días, las células en suspensión se dividieron en una proporción de 1:2.

50 Se preparó entonces un banco de células de evaluación (ECB). El día 28 de cultivo, las células que tenían una viabilidad superior al 60% se transfirieron a un nuevo experimento. El cultivo se hizo crecer en 200-300 ml de medio BAS (con Put, Glut, Synp y Fe) en un frasco centrifugador Bellco sin portadores. Según la densidad celular determinada mediante CASY, el cultivo en suspensión se dividió cada dos o tres días hasta una densidad celular de
55 partida de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml. Tras 16 días, cuando el cultivo celular alcanzó una viabilidad superior al 80%, se produjo el banco de células de evaluación (ECB) que consistió en seis viales de células.

Se descongeló un vial de ECB en un nuevo experimento. Se hicieron crecer las células durante cuatro días en un T175 en medio BAS con Put, Glut, Synp, Fe y Zn. Las células se transfirieron entonces a un frasco centrifugador Bellco que contenía hasta 600 ml de medio BAS con Put, Glut, Synp, Fe y Zn. De nuevo, cada dos o tres días se dividió el cultivo en suspensión hasta una densidad celular de partida de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml. El
60 día 13 de cultivo, se eliminaron 143 ml de la suspensión celular para la preparación de PMCB n.º 01, que consistió en 20 viales. Se expandieron las células y se llevaron a cabo pruebas de control de calidad para el PMCB n.º 01.

65 *Preparación y pruebas de control de calidad de PMCB n.º 04*

Se descongeló un vial de CHO/rFurina n.º 488-3 (ECB n.º 01) en el medio BAS que contenía Put, Glut, Synp, Fe y 5% de SBF. La mitad del cultivo de seis días se transfirió a un nuevo experimento para la adaptación a las condiciones libres de suero.

5 En este caso, la adaptación a las condiciones libres de suero no se llevó a cabo paso a paso, sino de forma abrupta. Se preparó un frasco centrifugador Bellco con medio BAS (con adición de Put, Glut, Synp y Fe) que no contenía ni SBF ni portadores. Las células se inocularon con una densidad celular de partida de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/ml. Debido a las repentinas condiciones libres de suero, el tiempo de duplicación de las células disminuyó hasta un nivel bastante bajo. Para evitar la dilución de las células hasta una concentración tal que el crecimiento
10 posiblemente podría ser inhibido, se cambió el medio mediante la centrifugación de la suspensión celular. El sedimento celular se resuspendió en medio de crecimiento fresco. Se llevaron a cabo las divisiones del cultivo cuando la densidad celular era superior a $4,0 \times 10^5$ células/ml. Tras haber alcanzado una viabilidad mínima de aproximadamente el 50% en el día 15 de cultivo, las células empezaron a recuperarse y, a partir del día 32 de cultivo, su viabilidad aumentó hasta entre el 85 y el 90%. El día 61 de cultivo, las células adaptadas se congelaron
15 como un ECB que consistió en 15 viales.

Se descongeló un vial de ECB en un nuevo experimento en medio BAS libre de suero que comprende Put, Glut, Synp y Fe. Después de que el cultivo se cultivara en matraces T175 durante siete días, se transfirió a un frasco centrifugador Bellco, donde las células crecieron durante dos días más. Luego, se sometió a prueba la adición de
20 Zn. Aproximadamente 100 ml de la suspensión celular centrifugada se resuspendió en medio BAS libre de suero que contenía Put, Glut, Synp, Fe y Zn. La suspensión se cultivó en un frasco centrifugador Bellcor. Según la densidad celular determinada mediante CASY, el cultivo en suspensión se dividió cada dos o tres días hasta una densidad celular de partida de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml.

25 Para la preparación de inóculo y para poder producir una gran cantidad de suspensión celular homogénea durante la generación de PMCB n.º 04, el cultivo celular se aumentó hasta 1000 ml en un frasco centrifugador Bellco. El día 2 de cultivo, se usaron 465 ml de la suspensión celular para producir PMCB n.º 04, que consistió en 20 ampollas. Se expandieron las células y se llevaron a cabo pruebas de control de calidad para el PMCB n.º 04.

30 La figura 4 expone una comparación de la distribución gráfica de los productores de rFurina en las poblaciones celulares de PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04. El 80,74% de las células en PMCB n.º 04 expresan rFurina. El 74,06% de las células en PMCB n.º 01 expresan rFurina.

Se generaron entonces los subclones CJ06-19/5F10 y CJ06-19/1E8 de CHO/rFurina n.º 488-3. Se descongeló una
35 ampolla del clon de CHO/rFurina n.º 488-3 y se traspasó el cultivo a un matraz T175. El día 17 de cultivo, se sometieron a prueba tres medios diferentes, medio BAP (desarrollado por Baxter), CD-CHO (proporcionado por Gibco) y ExCell 325PF CHO (proporcionado por JRH), cada uno de ellos contenía 5% de SBF. Tras cuatro días de crecimiento en matraces T175, las células que se hicieron crecer en medio ExCell se adaptaron a condiciones libres de suero.

40 Se retiraron el suero de las células en pequeños pasos. Todo el procedimiento abarcó tres experimentos. En primer lugar, las células dependientes del anclaje se cultivaron inicialmente en matraces T175 en ExCell 325PF CHO que contenía 5% de SBF. El suero se redujo entonces lentamente a 0,5% el día 13 de cultivo. Durante los siguientes 13 días de cultivo, se realizaron dos divisiones, en las que la concentración de suero se redujo aún más a 0,25% y la
45 viabilidad disminuyó a menos del 70%. Las células perdieron su comportamiento dependiente del anclaje, mostraron una forma cada vez más esférica y comenzaron a crecer en suspensión.

El último paso de la reducción de suero se produjo en un frasco centrifugador Techne en medio ExCell 325PF CHO que contenía 0,25% de SBF y sin portadores. Después de un periodo de cultivo de 23 días, la concentración de
50 suero alcanzó el 0%. Se dividieron y se cultivaron las células para mantener todos los parámetros relevantes dentro de su intervalo dado. La densidad celular se movió entre $0,15$ y $0,9 \times 10^6$ células/ml. La viabilidad se redujo a menos del 40% durante la primera semana, pero luego volvió a valores superiores al 90%. El día 42 de cultivo, se congelaron las células adaptadas en el ECB/CJ06-20 que consistió en 20 viales.

55 Las células fueron entonces subclonadas. Se diluyó una suspensión celular con ExCell 325PF CHO preacondicionado de tal manera que, 100 µl de la suspensión contenían teóricamente 0,5-1,0 células. En el experimento de subclonación, se llenaron cinco placas de 96 pocillos con 100 µl de esta suspensión celular por pocillo. El día después de la siembra de las células, se buscó en los pocillos las células individuales bajo un microscopio. Los pocillos que contenían una célula se marcaron y se observaron adicionalmente. La adición y el
60 intercambio de ExCell 325PF CHO preacondicionado se realizaron cuando fue necesario. Cuando la célula murió o en ausencia de división celular, durante las dos semanas siguientes, el pocillo relevante se excluyó del experimento.

Dos células individuales mostraron crecimiento. Los clones evolucionados, habiendo alcanzado un tamaño apropiado, se transfirieron a un pocillo de una placa de 24 pocillos. En este caso, el intercambio de ExCell 325PF
65 CHO preacondicionado también se realizó según el crecimiento y los requisitos del cultivo. Los subclones CJ06-19/5F10 y CJ06-19/1E8 se transfirieron a un matraz T25 los días 7 y 10 de cultivo, respectivamente.

5 Los ECB se prepararon en medio ExCell. Estos ECB presentan el material de origen para investigaciones adicionales sobre los dos subclones, tales como una readaptación de medios comprados de manera costosa a una formulación más económica, desarrollada por Baxter mismo. El ECB del subclón CJ06-19/5F10, CJ06-42, se expandió en medio ExCell 325PF CHO desde un T25, hasta un T75, hasta un T175, y luego en un frasco centrifugador Bellcor. El ECB/CJ06-63 que consistió en 10 viales se congeló de un cultivo del T175 el día 21. El ECB del subclón CJ06-19/1E8, CJ06-43, también se expandió en medio ExCell 325PF CHO. El cultivo se expandió desde un T25, hasta un T75, hasta un T175, y luego en un frasco centrifugador Bellcor. El ECB/CJ06-64 que consistió en 10 viales se congeló de un cultivo del T175 el día 18.

10 Los ECB (subclones 5F10 y 1E8) se adaptaron a medio BCS tal como se expone a continuación. Se descongeló el subclón CJ06-19/5F10 del clon ECB CJ06-19 en el experimento CJ06-66, y luego al añadir medio BCS al medio ExCell en un volumen creciente, se retiraron el medio ExCell de las células y las células adquirieron la capacidad de crecer en el medio BCS. El subclón CJ06-19/1E8 del clon ECB CJ06-19 se adaptó simultáneamente al medio BCS de una manera similar.

La Tabla 8 muestra todos los bancos de células libres de suero que se prepararon en el transcurso de este estudio

Tabla 8. .Sumario de los bancos de células libres de suero del clon de célula CHO n.º 488-3 que expresa rFurina

	N.º de prueba	Fecha	Nombre	Densidad celular/Amp	Amp.	Medio	Cont. de descongelación
PMC B n.º	DE06-02	10.03.06	ECB/DE06-02	$1,0 \times 10^7$	6	BAS+Put+Glut+Synp+Fe	ok
	CJ06-73	12.05.06	PMCB n.º 01	$1,5 \times 10^7$	20	BAS+Put+Glut+Synp+Fe+Zn	ok
PMC B n.º	CJ06-51	11.04.06	ECB/CJ06-51	$1,2 \times 10^7$	15	BAS+Put+Glut+Synp+Fe	ok
	SK06-65	12.05.06	PMCB n.º 04	$1,5 \times 10^7$	20	BAS+Put+Glut+Synp+Fe+Zn	ok
Subclones	CJ06-20	27.02.06	ECB/CJ06-20	$1,1 \times 10^7$	20	ExCell + Glut	n.d.
	CJ06-63	14.04.06	Clon: CJ06-19/5F10 ECB/CJ06-63	$1,0 \times 10^7$	10	ExCell + Glut	ok
	SK06-58	10.05.06	Clon: CJ06-19/5F10 ECB/SK06-58	$1,0 \times 10^7$	5	Excell + Glut/ BAS+Put+Glut+Synp+Fe (1:1)	ok
	SK06-83	19.06.06	ECB/SK06-83	$1,5 \times 10^7$	15	Excell + Glut/ BAS+Put+Glut+Synp+Fe+Zn (1:1)	ok
	SK06-151	03.11.06	Clon: CJ06-19/5F10 ECB/SK06-151	$1,0 \times 10^7$	5	BCS+Zn	n.d.
	CJ06-64	14.04.06	Clon: CJ06-19/1E8 ECB/CJ06-64	$1,0 \times 10^7$	10	ExCell + Glut	ok
	SK06-59	10.05.06	Clon: CJ06-19/1E8 ECB/SK06-59	$1,0 \times 10^7$	5	Excell + Glut/ BAS+Put+Glut+Synp+Fe (1:1)	ok
	SK06-84	19.06.06	ECB/SK06-84	$1,5 \times 10^7$	15	ExCell+Glut/BCS (1:1)	ok
	SK06-152	03.11.06	Clon: CJ06-19/1E8 ECB/SK06-152	$1,0 \times 10^7$	7	BCS+Zn	n.d.

Se expone en la tabla 9 una comparación de PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04 y los subclones 5F10 y 1E8.

Tabla 9: Comparación de PMCB n.º 01, PMCB n.º 04 y subclones 5F10 y 1E8

Población celular	Experimentos	Periodo de evaluación	Valores promedio de							
			Densidad celular [x10 ⁶ células/ml]	Viabilidad [%]	Actividad de furina [U/ml]	FACS [%]	μ [d ⁻¹]	g [h]	q _p [U/(10 ⁶ *d)]	Q _p [U/(ml*d)]
PMCB n.º 01	CJ06-69	29.04.-17.05.06	1,16	84,4	274,87	71,30	0,494	35,94	123,0	77,1
PMCB n.º 04	SK06-49, SK06-63	26.04.-17.05.06	1,10	94,4	287,03	72,02	0,614	28,52	207,7	96,8
Clon 5F10	CJ06-66, SK06-52	21.04.-17.05.06	0,59	94,3	105,57	83,30	0,523	37,43	135,0	40,8
Clon 1E8	CJ06-67, SK06-53	21.04.-17.05.06	0,59	94,8	95,55	88,34	0,512	39,01	114,4	35,7

Las poblaciones celulares cultivadas en los experimentos CJ06-69 así como SK06-49 y SK06-63 representan los cultivos precursores de las líneas celulares para los PMCB. Se hicieron crecer estas células en medio BAS (con la adición de Put, Glut, Synp, Fe y Zn), y se congelaron como PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04, respectivamente.

Se hicieron crecer los subclones 5F10 y 1E8 en medio ExCell 325PF CHO comercialmente disponible proporcionado por JRH. Dado que se prefirió la capacidad de crecer en un medio basado en la formulación de BAS, se eligieron PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04 para la producción adicional de rFurina.

Tal como se presenta en la tabla 10, las células de PMCB n.º 04 mostraron un mejor comportamiento de crecimiento en comparación con PMCB n.º 01. Las viabilidades y las velocidades de crecimiento fueron mayores en PMCB n.º 04, y los tiempos de duplicación de la generación fueron menores. La proporción de producción específica de la célula y volumétrica de la rFurina fue también mayor a lo largo del periodo de tiempo evaluado. En un experimento adicional, se confirmaron los datos relativos a las viabilidades. Se descongeló una ampolla de cada uno de los PMCB en un matraz T175 que contenía medio BCS con Zn como aditivo. Tal como se muestra en la tabla 10, la viabilidad de PMCB n.º 04 fue de nuevo mayor que la de PMCB n.º 01.

Tabla 10. Experimentos de descongelación de PMCB n.º 01 y PMCB n.º 04

Población celular	Experimento	Densidad celular [x 10 ⁷ células/vial]	Viabilidad [%]
PMCB n.º 01	CJ06-77 [75]	1,05	68,7
PMCB n.º 04	SK06-67 [76]	0,99	77,4

Por tanto, se eligió PMCB n.º 04 como material de origen para la futura producción de un banco de células maestro (MCB) de rFurina y todos los bancos de células en funcionamiento (WCB). El PMCB n.º 04 que consiste en 20 viales se estableció en conformidad con las normas vigentes de las buenas prácticas de tejidos (GTP). Las pruebas de control de calidad (QC) se realizaron de acuerdo con los requisitos de la directriz Q5D de ICH. El PMCB n.º 04 fue elegido para producir rFurina en los procedimientos de fabricación.

El medio de crecimiento está libre de sustancias derivadas de humanos o animales, y es de desarrollo propio. Una vez eliminadas las células mediante filtración, el sobrenadante que contiene la rFurina se concentra mediante ultrafiltración. Tras la purificación por cromatografía de intercambio, se pretende que la actividad de la disolución de rFurina sea de al menos 200 unidades de rFurina/ml.

Se llevaron a cabo pruebas para detectar micoplasmas, virus, agentes extraños y para determinar la esterilidad y eficiencia de expresión. Los criterios de selección son una alta actividad de furina (por ejemplo, proteína furina, ELISA) y la homogeneidad de la población celular en inmunofluorescencia (FACS), realizada en diferentes subclones en comparación con los clones iniciales n.º 488-3 y n.º 289-20, respectivamente. Además, los perfiles de impureza deben compararse cualitativamente (por ejemplo, mediante patrones de picos UV tras RP-HPLC o mediante técnicas SDS-PAGE/Coomassie).

EJEMPLO 3: OPTIMIZACIÓN PARA LA FABRICACIÓN DE FURINA RECOMBINANTE EN MEDIO LIBRE DE PROTEÍNA ANIMAL

Este ejemplo describe el procedimiento de desarrollo y optimización para el cultivo del clon de CHO n.º 488-3 que

expresa rFurina. Se llevó a cabo una optimización específica de medio con respecto a la concentración de NaHCO_3 , aminoácidos y glucosa, lo que resultó en un aumento de las velocidades de crecimiento celular y unas productividades mayores del procedimiento de fermentación. La optimización para los parámetros de procedimiento controlados en línea se realizó con la formulación del medio optimizada para pO_2 (10%, 20% y 50%), y se realizó un experimento factorial para determinar el pH óptimo (intervalo de 7,1-7,3) y la temperatura (intervalo de 35,1°C-37,9°C), que resultó en una mejora significativa del rendimiento para el clon de CHO n.º 488-3 cuando la fermentación se llevó a cabo a temperaturas más bajas entre 35°-36°C.

Como posibles modos de producción, se compararon los cultivos de quimiostato y los cultivos de realimentación discontinua, indicando que ambos tipos de procedimientos son adecuados para la fabricación de rFurina, y dan rendimientos comparables con ajustes de parámetros idénticos. Se llevaron a cabo experimentos específicos para investigar la influencia de los tipos y velocidades de agitación en diferentes configuraciones de biorreactores. Se demostró que las variaciones en la configuración del biorreactor influyen fuertemente en las velocidades de crecimiento y las tasas de expresión específicas, las densidades celulares y, por lo tanto las productividades volumétricas, y que en condiciones de velocidades de agitación aumentadas, los rendimientos podrían aumentarse significativamente. En conjunto, la influencia de los principales parámetros del procedimiento anterior de rFurina está bien caracterizada con respecto a su efecto, y podría transferirse un procedimiento de alto rendimiento a la planta piloto para la fabricación preclínica y clínica. Los detalles se exponen a continuación.

Se desarrolló internamente un subclón n.º 488-03 que se adaptó a un medio libre de suero e insulina. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo en un medio libre de SBF e insulina (medio BACD) como la formulación de medio básico (ver tabla 11).

Tabla 11. Componentes del medio básico (medio BACD)

Componente	Concentración [g/kg]
DMEM/F12 (1:1)	11,76
L-glutamina	0,6
Etanolamina	0,00153
Synperonic	0,25
Putrescina.2HCl	0,0036
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0006
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,00000125
NaHCO_3	2,0

Con el fin de mejorar el crecimiento celular y proporcionar condiciones óptimas para la propagación celular, se realizó un análisis de aminoácidos del sobrenadante de un cultivo de quimiostato (ver tabla 12). Como resultado, se añadieron tres aminoácidos esenciales al medio, es decir, metionina (10 mg/l), leucina (40 mg/l) y fenilalanina (10 mg/l). La fermentación se realizó en un biorreactor de 1,5 L a 37°C, pH 7,15 y una pO_2 del 20%.

Tabla 12: Análisis de aminoácidos por HPLC

Aminoácidos	BACD_24_06_014_026	FUR_06/10_M04_K06	FUR_06/10_M04_K07
	Área del pico [%]	Área del pico relativa [%]	Área del pico relativa [%]
Ácido aspártico	100,00	24,04	9,88
Ácido glutámico	100,00	57,78	24,89
Serina	100,00	14,37	15,35
Asparagina H_2O	100,00	15,03	19,17
Glicina	100,00	103,55	90,58
Glutamina	100,00	19,26	23,14
Histidina	100,00	45,59	45,32
Treonina	100,00	63,09	61,39
Arginina	100,00	72,22	74,25
Alanina	100,00	1513,36	1518,46
Prolina	100,00	58,54	55,36
Tirosina	100,00	46,37	47,63
Cistina	100,00	53,43	56,39
Valina	100,00	42,75	42,11
Metionina	100,00	13,23	11,51
Isoleucina	100,00	48,39	48,79
Leucina	100,00	23,58	20,63
Lisina HCl	100,00	41,85	40,65
Fenilalanina	100,00	34,99	33,00
% de triptófano	100	69,1	68,8

BACD_24_06_14_026 ... medio básico (véase materiales y métodos)
 FUR_06/10_M04_K06 ... lote de fermentación, día 6 de cultivo
 FUR_06/10_M04_K07 ... lote de fermentación, día 7 de cultivo

El área del pico del respectivo aminoácido en el diagrama de HPLC del medio básico se estableció en 100%. Se determinó la disminución del respectivo aminoácido mediante comparación con el área del pico obtenida el día 6 y el día 7 del cultivo de quimiostato,

Debido a las bajas concentraciones de glutamina en el sobrenadante del cultivo, se añadió glutamina al medio (300 mg/l) para dar una concentración final de glutamina de 900 mg/l. Tras la adición de glutamina al medio, la velocidad de crecimiento aumentó desde 0,55 d⁻¹ hasta 0,67 d⁻¹ (véase las tablas 13 y 14). Mediante la adición de estos tres aminoácidos mencionados anteriormente (es decir, metionina (10 mg/l), leucina (40 mg/l) y fenilalanina (10 mg/l)) al medio, la velocidad de crecimiento de las células podría aumentarse de nuevo (0,69 d⁻¹) (véase la tabla 15). La productividad volumétrica subió a aproximadamente 267 kU/l/d (= + 13%) y la productividad específica mostró un aumento del 16%. La aportación complementaria de glutamina, metionina, leucina y fenilalanina al medio mostró un efecto positivo en el crecimiento celular, y la actividad volumétrica y específica, y por tanto se mantuvo para la preparación de medio adicional.

Tabla 13. Datos de fermentación del cultivo de quimiostato FUR_06/10-M04 desde el día 6 hasta el día 9 de cultivo

Experimento	glc	gln	pH	D	CC	μ	Furina	P	qP
FUR_06/10-M04	[g/l]	[g/l]	NOVA	[1/d]	[1 E6/ml]	[1/d]	[UI/ml]	[kUI/ml]	[UI/C/d]*10 ⁶
Días 6-9	1,58	0,10	7,16	0,494	2,35	0,548	306,55	151	64

Tabla 14. Datos de fermentación del cultivo de quimiostato FUR_06/10-M04 después de la aportación complementaria de 300 mg/l de glutamina al medio el día 12

Experimento	glc	gln	pH	D	CC	μ	Furina	P	qP
FUR_06/10-M04	[g/l]	[g/l]	NOVA	[1/d]	[1 E6/ml]	[1/d]	[UI/ml]	[kUI/ml]	[UI/C/d]*10 ⁶
Días 15-21	1,47	0,35	7,16	0,668	2,27	0,673	352,68	236	104

Tabla 15. Datos de fermentación del cultivo de quimiostato FUR_06/10-M04 después de la adición de metionina (10 mg/l), leucina (40 mg/l) y fenilalanina (10 mg/l) al medio el día 22

Experimento	glc	gln	pH	D	CC	μ	Furina	P	qP
FUR_06/10-M04	[g/l]	[g/l]	NOVA	[1/d]	[1 E6/ml]	[1/d]	[UI/ml]	[kUI/ml]	[UI/C/d]*10 ⁶
Días 26-29	1,37	0,38	7,13	0,713	2,20	0,695	373,80	267	121

Para verificar si las cantidades complementadas de los aminoácidos en el medio eran suficientes, se realizó otro análisis de aminoácidos de un cultivo de quimiostato (10 l). El cultivo se había suministrado con 300 mg/l de glutamina y las respectivas cantidades de los tres aminoácidos. Las muestras se tomaron los días 7 y 15 de cultivo, y las condiciones de cultivo fueron similares a las mencionadas anteriormente. Los resultados (véase la tabla 16 donde solo se muestran los datos de metionina, leucina y fenilalanina) confirmaron que cantidades suficientes de los aminoácidos complementados estaban presentes en el caldo de fermentación.

Tabla 16. Cantidad relativa de metionina, leucina y fenilalanina en un cultivo de quimiostato (FUR 06/17_F04) complementado con glutamina (300 mg/l), metionina (10 mg/l), leucina (40 mg/l) y fenilalanina (10 mg/l)

Aminoácido	Área del pico [%]	Área del pico relativa [%]	Área del pico relativa [%]
	BACD-24-06-030-057	FUR 06/17_F04_K07	FUR 06/17_F04_K15
Metionina	100,00	47,5	61,7
Leucina	100,00	50,3	65,4
Fenilalanina	100,00	50,1	65,2

Reducción de la concentración de NaHCO₃ y aumento de la concentración de glucosa. Se investigó la influencia de las altas concentraciones de CO₂ disueltas en el cultivo celular en el crecimiento y la productividad. Debido a la producción a gran escala en un biorreactor, puede esperarse una mayor concentración de CO₂ en el cultivo celular que en biorreactores de 2,5-32 l. Por tanto, se llevaron a cabo dos ciclos de fermentación en paralelo, un ciclo con una concentración de CO₂ de aproximadamente el 7,5% y el otro con una concentración de CO₂ de aproximadamente el 12%. La concentración de CO₂ se ajustó variando la fracción de CO₂ en el flujo de espacio de cabeza. La concentración de CO₂ en el cultivo celular se midió mediante el análisis de muestras extraídas con el instrumento NOVA. La fermentación se llevó a cabo a 37°C, a un pH de 7,15 y con una pO₂ del 20%.

Una concentración de CO₂ del 11-12% tuvo una influencia negativa en el crecimiento y la productividad celulares. A esta concentración de CO₂, se alcanzó una velocidad de crecimiento de 0,29 d⁻¹ en un intervalo de 12 días a un recuento celular de 1,1x10⁶ células/ml y una velocidad de dilución de 0,30 d⁻¹. En el ciclo de fermentación con

aproximadamente el 7,5% de CO₂, se alcanzó una velocidad de crecimiento de 0,52 d⁻¹ a un recuento celular de 1,49x10⁶ células/ml y una velocidad de dilución de 0,53 d⁻¹ en el mismo intervalo. A concentraciones superiores de CO₂, la viabilidad se redujo hasta el 86,1%, en comparación con el 95,9% al 7,5% de CO₂. Además, la productividad volumétrica se redujo hasta aproximadamente el 36% y la productividad específica hasta el 50%. Debido a la alta concentración de CO₂, la velocidad específica de captación de glucosa también se redujo (-39%). La influencia negativa de una concentración aumentada de CO₂ (11-12%) en el crecimiento celular y la productividad fue bastante obvia y, por tanto, resulta óptima llevar a cabo la fermentación al 7,5% de CO₂.

Tal como se expuso anteriormente, los experimentos mostraron que cuando la concentración de CO₂ se aumentaba hasta el 12% en el biorreactor de 1.000 l, podía esperarse una fuerte disminución en el rendimiento del clon 488-3 de CHO-furina. Por tanto, se decidió reducir la concentración de NaHCO₃ en el medio desde 2 g/l hasta 1,5 g/l. Una cantidad menor de NaHCO₃ en el medio también disminuyó la capacidad de tamponamiento del medio y, por tanto, se compararon dos ciclos de fermentación (10 l), uno con glucosa 3,15 g/l y NaHCO₃ 2 g/l en el medio (FUR_06/24_F01) y otro con glucosa 4,65 g/l y NaHCO₃ 1,5 g/l (FUR_06/26_F04).

Para simular las condiciones de un biorreactor a gran escala (1.000 l), la concentración de CO₂ disuelto durante la fermentación se ajustó al 7-8% en el fermentador con NaHCO₃ 2 g/l y al 6-7% en el fermentador con NaHCO₃ al 1,5 g/l gaseando CO₂ de forma constante en el espacio de cabeza. Las velocidades de crecimiento de ambos cultivos fueron similar (0,58 y 0,56 d⁻¹) y los cultivos mostraron productividades volumétricas y viabilidades comparables. Sin embargo, la velocidad específica de captación de glucosa fue ligeramente superior en el cultivo con una menor concentración de NaHCO₃ (0,83 mg/10⁶ células/d frente a 0,67 mg/10⁶ células/d). Por tanto, una concentración de glucosa de 4,65 g/l se consideró razonable y se mantuvo en la preparación del medio adicional.

Investigación de la concentración de Synperonic F68 en el medio de furina. La concentración regular de Synperonic F68 en el medio de cultivo celular se ajustó a 0,25 g/l. El propósito de Synperonic F68 en el medio es proteger a las células del daño debido a la oxigenación sumergida. Por tanto, se llevó a cabo un experimento en 2 biorreactores de 10 l, donde se investigó una concentración aumentada de Synperonic F68 de 1,0 g/l frente a la concentración regular de 0,25 g/l. La fermentación se llevó a cabo a 35,8°C, a un pH de 7,30 y con una pO₂ del 20%.

Al aumentar la concentración de Pluronic (Synperonic F68), pudo lograrse una velocidad de crecimiento específica y una densidad celular ligeramente superiores. Por tanto, debido al aumento de la productividad específica, pudo lograrse una productividad volumétrica proporcionalmente mayor de 365 frente a 278 kU/l/d.

Los sobrenadantes de estos experimentos se recogieron y se filtraron con un filtro de profundidad (discos Cuno Cart.Z08P4A30SP 4), seguido de un filtro de membrana (Pall Fluorodyne II KA2DFLP2). Los sobrenadantes filtrados se concentraron mediante ultrafiltración (Sartorius 30S1463901E--SG PSU 10 KD, 0,2 m²) y se diafiltraron frente al tampón de diafiltración de furina. El concentrado estéril filtrado (Sartorius Sartobran P 523130748-00 0,45/0,2 µ) se purificó en una columna Capto MMC. Los resultados de estos experimentos de purificación revelaron que el aumento de Synperonic F68 no tiene influencia perjudicial en la calidad y/o la pureza de la rFurina purificada. No pudieron encontrarse concentraciones elevadas de Synperonic F68 en el eluato de la columna Capto MMC, que fueron <0,15 mg/ml en ambos eluatos.

A pesar de estos resultados, la concentración de Synperonic F68 en el medio de rFurina se mantuvo en los 0,25 g/l originales. Sin embargo, en el caso de problemas de ampliación a escala debido a la oxigenación sumergida, podría considerarse un aumento de la concentración de Synperonic de hasta 1,0 g/l, con la posibilidad de rendimientos aumentados sin la influencia perjudicial del producto final de furina.

Composición del medio final para la producción de rFurina en fermentación. Basándose en los experimentos de optimización del medio, se muestra que la siguiente composición del medio es óptima para la fermentación del clon 433-3 de CHO en cultivos para la producción de rFurina en biorreactores.

Tabla 17. Componentes del medio básico y medio de fermentación optimizado

Componente	Medio básico	Medio optimizado
	Concentración [g/kg]	Concentración [g/kg]
DMEM/F12 (1:1)	11,76	11,76
l-Glutamina	0,6	0,9
D-glucosa	-	1,5
Etanolamina	0,00153	0,00153
Synperonic	0,25	0,25
Putrescina.2HCl	0,0036	0,0036
Metionina	-	0,01
Leucina	-	0,04
Fenilalanina	-	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0006	0,0006

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00000125	0,00000125
NaHCO ₃	2,0	1,5

También se investigó la influencia de diferentes puntos de referencia de pO₂ en la velocidad de crecimiento y la productividad. Se sometieron a prueba tres puntos de referencia de pO₂ diferentes, es decir el 10%, el 20% y el 50%. Los experimentos se realizaron en biorreactores de 1,5 l con gasificación a través del espacio de cabeza. Todos los ciclos de fermentación se llevaron a cabo a 35,1°C a pH 7,20. La comparación de los ciclos de fermentación al 10, el 20 y el 50% de pO₂ mostraron un ligero aumento de las velocidades de crecimiento (0,59, 0,62 y 0,65 d⁻¹) al aumentar el punto de referencia de pO₂. Asimismo, la productividad volumétrica fue mayor para el 50% de pO₂. Los recuentos celulares medios de los diferentes ciclos de fermentación fueron muy similares. Por tanto, el aumento en la productividad volumétrica fue el resultado de una creciente velocidad de crecimiento.

En consecuencia, un punto de referencia de pO₂ del 50% pareció influir positivamente en la velocidad de crecimiento, y como resultado, la productividad volumétrica fue aproximadamente un 4% mayor que en condiciones normales (= 20% de pO₂). No se observó efecto sobre la viabilidad. Por tanto, se podría confirmar que un punto de referencia de pO₂ = 20% y un intervalo para la regulación de entre el 10%-50% son adecuados para la fermentación del clon n.º 488-3 de CHO.

Optimización de la temperatura y el pH para maximizar la productividad volumétrica. Se investigó la influencia del pH y de la temperatura en el rendimiento del clon de CHO-furina. Al utilizar un "método de diseño de experimentos", se combinaron diferentes temperaturas con diferentes valores de pH para determinar las condiciones que daban como resultado la productividad volumétrica máxima. Se combinaron cinco temperaturas con tres valores de pH según la "Matriz Doehlert", dando como resultado siete combinaciones de temperatura y pH, tal como se muestra en la figura 5.

La combinación de 36,5°C y pH 7,20 se eligió como punto central, que se aplicó a dos lotes de fermentación. La tabla 18 expone las condiciones de cultivo utilizadas en los diferentes lotes de fermentación.

Tabla 18. Configuración experimental de la Matriz Doehlert: Condiciones de cultivo de los diferentes lotes de fermentación

Lote de fermentación	Temperatura [°C]	pH
FUR_06/43-B07	35,1	7,20
FUR_06/43-B05	35,8	7,10
FUR_06/40-B03	35,8	7,30
FUR_06/40-B01	36,5	7,20
FUR_06/43-B02	36,5	7,20
FUR_06/40-B08	37,2	7,10
FUR_06/40-B04	37,2	7,30
FUR_06/40-B06	37,9	7,20

Tabla 19. Valores medios de los datos de fermentación de las fermentaciones FUR_06/40-B01,-B03,-B04,-B06,-B08 y FUR_06/43-B02,-B05,-B07

Lote de fermentación	Temp.	pH	CC	μ	Furina	P ¹⁾	qP ¹⁾	Viabilidad
	[°C]		[10 ⁶ /ml]	[1/d]	[UI/ml]	[kUI/l/d]	[U/10 ⁶ /d]*	[%]
FUR_06/43-B07	35,1	7,20	1,74	0,595	930	543	312	97,7
FUR_06/40-B03	35,8	7,30	1,64	0,632	621	379	232	97,6
FUR_06/43-B05	35,8	7,10	1,73	0,647	683	429	250	98,5
FUR_06/40-B01	36,5	7,20	1,78	0,696	439	309	174	97,9
FUR_06/43-B02	36,5	7,20	1,66	0,684	454	310	186	96,8
FUR_06/40-B04	37,2	7,30	1,71	0,642	284	184	108	96,8
FUR_06/40-B08	37,2	7,10	1,68	0,652	338	215	128	98,3
FUR_06/40-B06	37,9	7,20	1,52	0,473	143	65	43	96,1

¹⁾ la productividad volumétrica media y específica media durante 5 días de cultivo se calcularon formando el valor medio de las productividades individuales

Los datos se analizaron estadísticamente con la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), utilizando el software "Minitab". RSM explora las relaciones entre varias variables explicativas y una o más variables de respuesta. La idea principal de RSM es utilizar un conjunto de experimentos diseñados para obtener una respuesta óptima. El análisis se centró en las productividades volumétrica y específica, así como en la velocidad de crecimiento.

Análisis de los datos en referencia a la productividad volumétrica. Como primera etapa, se creó un gráfico de

superficie (figura 6). Las coordenadas de los datos en la figura 6 están marcadas como puntos. La superficie muestra la correlación asumida de los datos individuales.

La gráfica de superficie supone una correlación lineal entre los parámetros temperatura/pH y la productividad volumétrica de respuesta. El gráfico indica un aumento de la productividad volumétrica con disminución de la temperatura. La influencia del pH se considera débil. Los cálculos subsiguientes mostraron una correlación lineal de los datos (cálculo no mostrado). Mediante análisis de varianza, se generó una ecuación que describe la correlación entre el pH, la temperatura y la productividad volumétrica:

$$P = 7693,1 - 162,4 \cdot \text{Temp} - 202,8 \cdot \text{pH}$$

Basándose en el modelo matemático, se generó un gráfico de contorno (figura 7) que ilustra la influencia de la temperatura y el pH en la productividad volumétrica. Los puntos indican las condiciones (pH/temp.) que se habían sometido a prueba experimentalmente.

El gráfico de contorno muestra que el área, donde puede esperarse una productividad volumétrica máxima, es a 35,1°C y a pH de aproximadamente 7,10. Ambos valores se encuentran en el borde del diseño experimental, lo que significa que el máximo real podría encontrarse incluso por debajo de esos valores. Además, el gráfico de contorno muestra que la influencia del pH en la productividad volumétrica es marginal y ligeramente superior a valores de pH bajos.

La gráfica de superficie (figura 8), que es una ilustración tridimensional del modelo matemático, da el mismo resultado que la gráfica de contorno: la gran influencia de la temperatura y la escasa influencia del pH en la productividad volumétrica.

Análisis de los datos en referencia a la velocidad de crecimiento μ . La correlación de la velocidad de crecimiento con la temperatura y el pH se describe en una ecuación cuadrática. De nuevo, puede encontrarse una gran influencia de la temperatura y una escasa influencia del pH. La fuerte variación de la velocidad de crecimiento dificulta el diseño de un modelo matemático. El análisis de varianza y regresión dio la siguiente ecuación:

$$P = -103,539 + 5,706 \cdot \text{Temp} - 0,079 \cdot \text{Temp}^2 - 0,233 \cdot \text{pH} - 0,020 \cdot \text{pH}^2$$

La influencia del pH en la velocidad de crecimiento no puede determinarse estadísticamente, como lo indica el alto valor P para las condiciones de pH que se calculó que eran de 0,99 (cálculo no mostrado).

La gráfica de superficie (figura 9) ilustra la correlación modelada tridimensionalmente, demuestra la relación cuadrática, y muestra una velocidad de crecimiento máxima a 36,5°C.

El análisis de los datos muestra una correlación similar de la productividad específica con la temperatura y el pH a la observada para la productividad volumétrica (figura 10). La correlación se describe mediante una ecuación lineal. La influencia del pH es de nuevo baja, como lo demuestra el análisis de varianza (cálculo no mostrado):

$$qP = 4261,40 - 93,35 \cdot \text{temp} - 93,77 \cdot \text{pH}$$

En resumen, los experimentos para la optimización de la temperatura y del pH y el posterior análisis de los datos dieron un resultado bastante claro. La mayor productividad volumétrica, que se considera el parámetro más importante para la optimización del proceso, se logró mediante el cultivo a la temperatura más baja (35,1°C) y al pH más bajo (7,10). La influencia del pH es estadísticamente poco significativa, y un valor de pH de entre 7,10 y 7,30 daría resultados muy similares. Al disminuir la temperatura desde 37°C hasta 35,1°C, la productividad volumétrica podría elevarse desde aproximadamente 200 kU/l/d hasta 540 kU/l/d, que es 2,7 veces superior (figura 11). Basándose en estos resultados, los nuevos puntos de referencia para la temperatura y el pH, para el cultivo del clon de CHO-furina en el modo de quimiostato se determinaron como 35,1°C y 7,15.

Comparación del modo de quimiostato con el modo de realimentación discontinua. El cultivo del clon de CHO-furina en el modo de quimiostato a una temperatura baja (35,1°C) dio como resultado altos rendimientos en experimentos a pequeña escala (1,5 l, 2,5 l, 10 l y 32 l), y se consideró que el método de cultivo era apropiado para el cultivo a gran escala para la producción de rFurina. Sin embargo, los ciclos de fermentación inicial a gran escala (biorreactor de 1200 l en la instalación PP1) mostraron una fuerte disminución de la velocidad de crecimiento en el modo de quimiostato. Como alternativa, para conseguir velocidades de crecimiento mayores, el modo de realimentación discontinua se configuró en gran escala. Los experimentos en la escala de biorreactor de 10 l se llevaron a cabo para comparar el crecimiento y la productividad en el modo de quimiostato con el modo de realimentación discontinua. Las células se cultivaron a 36,5°C a un pH de 7,15 y una pO_2 del 20%. El lote se dividió en un recuento celular de $0,6-0,7 \times 10^6$ células/ml cada día dos días de cultivo.

Las fermentaciones de quimiostato y de realimentación discontinua se realizaron en paralelo, utilizando el mismo cultivo celular como inóculo. Las células se cultivaron en el modo de quimiostato hasta el día 6. Luego, un ciclo de

fermentación se cambió al modo de realimentación discontinua (FUR_06_50-F03) mientras que el otro se continuó en el modo de quimiostato (FUR_06_51-F04). El cultivo en el modo de realimentación discontinua dio como resultado recuento celular medio de $2,22 \times 10^6$ células/ml al final del lote, con una velocidad de crecimiento de $0,64 \text{ d}^{-1}$ (tabla 20). En el modo de quimiostato, se obtuvo una velocidad de crecimiento de $0,50 \text{ d}^{-1}$ con un recuento celular promedio de $1,67 \times 10^6$ células/ml. Debido al recuento celular y la velocidad de crecimiento mayores en el modo de realimentación discontinua, la productividad volumétrica fue también mayor (238 frente a 197 kU/l/d).

Los datos indican que el modo de realimentación discontinua es un método de cultivo preferible para el clon de CHO-Furina en la escala de 10 l, lo que da como resultado incluso productividades volumétricas ligeramente superiores que en el modo de quimiostato (a $36,5^\circ\text{C}$ y un pH de 7,15). Sin embargo, en el modo de realimentación discontinua, los procesos de recogida y posteriores se restringen a determinados intervalos, mientras que en el modo de quimiostato, la recogida puede realizarse de forma continua. Por tanto, cada método presenta sus ventajas. No se realizaron experimentos de optimización para los parámetros del modo de realimentación discontinua como para los recuentos celulares óptimos al final de un lote o para la mejor proporción de división.

Tabla 20. Valores medios de los datos de fermentación de los ciclos de fermentación FUR_06_51-F04 (quimiostato) y FUR_06_50-F03 (realimentación discontinua)

Lote de fermentación	Vol.	Modo	D	μ	CC	Furina	P
			[1/d]	[1/d]	[1 E6/ml]	[U/l]	[kU/l/d]
FUR_06_51-F04	10 l	quimiostato	0,494	0,497	1,67	401,4	198
FUR_06_50-F03	10 l	realimentación discontinua	-	0,637	2,22 (final) ¹⁾	539,8	238 ²⁾

¹⁾ valor medio de los recuentos celulares al final de cada lote (2 lotes)

²⁾ valor medio de las productividades al final de cada lote (2 lotes)

Investigaciones de ampliación a escala. Comparación de los impulsores tipo Rushton frente a tipo bola a diferentes velocidades de agitación. Se investigó la influencia del tipo de agitador en la velocidad de crecimiento y la productividad. La configuración convencional utilizada en los biorreactores para experimentos con el clon de CHO-furina comprendió un impulsor Rushton y cuatro placas deflectoras. El biorreactor de 1.000 l para la producción de rFurina estaba equipado con tres pares de impulsores de bolas sin ninguna placa deflector. Por tanto, se llevó a cabo un experimento para someter a prueba tres configuraciones diferentes en biorreactores de 10 l: un reactor estaba equipado con la configuración convencional, otro reactor con dos pares de impulsores de bolas y sin placas deflectoras, y un tercer reactor se montó como el convencional pero la velocidad de agitación se redujo desde 170 rpm hasta 90 rpm.

La tabla 21 ofrece una visión general de las configuraciones del biorreactor. La velocidad de agitación de 60 rpm con impulsores de bolas dio una velocidad periférica similar a la del impulsor Rushton a 90 rpm (véase la tabla 21). Sin embargo, las velocidades periféricas no pueden equipararse entre sí debido a la diferente geometría de los impulsores (forma, diámetro).

Tabla 21. Configuraciones de biorreactor de 10 l para el experimento de impulsor/velocidad de agitación

Lote de fermentación	Tipo/diámetro de impulsor	Niveles	Placas deflectoras	Velocidad de agitación	Velocidad periférica
FUR_06/37-F03	Rushton 80 mm	2	4	170	$0,712 \text{ m s}^{-1}$
FUR_06/35-F01	Rushton 80 mm	2	4	90	$0,377 \text{ m s}^{-1}$
FUR_06/38-F04	De bolas 140 mm/39,5 mm	2	-	60	$0,440 \text{ m s}^{-1}$

Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: 37°C , pH 7,15, pO_2 del 20% y pCO_2 del 6-7%. (Medio: Glc $4,65 \text{ g/l}$, NaHCO_3 $1,5 \text{ g/l}$). La comparación de los datos de fermentación mostró que el rendimiento en el biorreactor con la configuración convencional, es decir equipado con el impulsor Rushton y agitado a una velocidad de 170 rpm, fue superior que en los biorreactores con las otras configuraciones (tabla 22). El uso de impulsores de bolas a 60 rpm dio como resultado una velocidad de crecimiento algo menor ($0,57$ frente a $0,61 \text{ d}^{-1}$), una productividad volumétrica más baja (197 frente a 227 kU/l/D) en comparación con el impulsor Rushton a 170 rpm. Sin embargo, la viabilidad apenas se vio afectada. El uso de un biorreactor agitado con impulsor Rushton a una velocidad de agitación de 90 rpm en lugar de 170 rpm disminuyó claramente la velocidad de crecimiento ($0,54$ frente a $0,61 \text{ d}^{-1}$), la productividad volumétrica (175 frente a 227 kU/l/D) y la productividad celular específica (115 frente a $138 \text{ U}/10^6$ células/día).

Los datos de este experimento mostraron que tanto el impulsor de bolas a 60 rpm como los impulsores Rushton a una velocidad de agitación reducida, dan como resultado un rendimiento disminuido del clon de CHO-furina en comparación con los impulsores Rushton a 170 rpm. Sin embargo, los resultados también revelaron que es posible utilizar un impulsor de bolas para el cultivo del clon de CHO-furina. Entre las configuraciones que se sometieron a prueba, la configuración con el impulsor Rushton a 170 rpm y cuatro placas deflectoras mostró las condiciones más

difíciles. En particular, sin embargo, no se observó una disminución de la viabilidad celular en estas condiciones, lo que indica una alta resistencia mecánica del clon de CHO-furina investigado.

Tabla 22. Valores medios de los datos de fermentación de tres ciclos de fermentación del clon de CHO-Furina en biorreactores con diferentes configuraciones (tipo de impulsor, placas deflectoras)

Lote de fermentación	Configuración	CC	D	Furina	μ	P	qP	Viabilidad
		[10 ⁶ /ml]	[d ⁻¹]	[UI/ml]	[d ⁻¹]	[kU/l/d]	[U/10 ⁶ /d]	[%]
FUR_06/37-F03	Rushton 170 rpm	1,65	0,628	361,37	0,614	227	138	95,4
FUR_06/38-F04	Impulsor de bolas 60 rpm	1,52	0,600	328,10	0,568	197	130	94,1
FUR_06/35-F01	Rushton 90 rpm	1,53	0,574	305,31	0,544	175	115	94,3

Comparación de diferentes velocidades de agitación con impulsores de cuchillas inclinadas en biorreactores de 32 l. Para la campaña de ciclos de GMP ORFURFB07002 en el PP1, el biorreactor (volumen de trabajo de 950 l) se equipó con un impulsor de tipo cuchilla inclinada (2 piezas, d = 700 mm) en lugar de los impulsores de tipo bola utilizados anteriormente.

Se llevaron a cabo ciclos de realimentación discontinua de dos días durante esta campaña. Para evaluar este cambio en comparación con las campañas anteriores, se configuró un biorreactor de 32 l con un tipo similar de impulsores de cuchillas inclinadas (1 pieza, d = 140 mm), y se llevaron a cabo las fermentaciones utilizando la suspensión celular de la instalación PP1 y medio para garantizar que se usaban materiales comparables.

Se llevó a cabo un proceso similar de realimentación discontinua, donde se iniciaron 2-3 ciclos consecutivos discontinuos de dos días, con una densidad celular de partida de 0,5x10⁶ células/ml. El experimento se llevó a cabo a 2 velocidades de agitación diferentes, es decir a 55 rpm y a 120 rpm. Las condiciones de cultivo fueron idénticas que las condiciones de cultivo utilizadas en el PP1: pH-SP 7,15, Temp-SP 35,5°C, pO₂-SP 20%. Los datos del último lote se compararon después de la adaptación a las respectivas condiciones de agitación.

Tabla 23. Velocidad de crecimiento, recuento celular y productividad volumétrica de los lotes del ciclo FUR_07/06-F07 con impulsores de cuchillas inclinadas en el biorreactor de 32 l

FUR_07/06-F07	Velocidad de agitación	CC ¹⁾	División ²⁾	Furina	μ	P ³⁾
Intervalo	[rpm]	[10 ⁶ /ml]	1:x	[UI/ml]	[d ⁻¹]	[kU/l/d]
Lote K02-K04	120	1,95	3,89	1197,8	0,680	445
K10-K12	50	1,50	3,13	812,0	0,570	276

¹⁾ recuento celular al final de cada lote

²⁾ proporción de división teórica que va a aplicarse en un procedimiento de realimentación de 2 lotes: proporción de división = $e^{(2 \times \mu)}$

³⁾ cálculo de la productividad volumétrica: $P = (1 - (1/\text{proporción de división})) \times \text{título de producto}/2 \text{ días}$

El experimento demostró nuevamente el efecto de las condiciones de agitación en las velocidades de crecimiento específicas del clon 488-3 de CHO. El aumento de las velocidades de crecimiento condujo a mayores densidades celulares al final del lote, cuando se aplicaron las mismas densidades celulares de partida. Las productividades volumétricas aumentaron desde 276 kU/l/D hasta 445 kU/l/D (+61%), mientras que la densidad celular final aumentó en un 30% (1,95 frente a 1,5x10⁶ células/ml). Estos resultados indican que el aumento de la velocidad de agitación tuvo un impacto positivo en la productividad celular específica.

También podría concluirse que los ciclos de fermentación, que dieron como resultado productividades promedio de alrededor de 200 kU/l/D, fueron principalmente el resultado de las bajas velocidades de agitación de 20 rpm, y no debido al diseño del impulsor en sí. En este caso podría demostrarse que los impulsores de cuchillas inclinadas pueden dar como resultado rendimientos >400 kU/l/D, si las velocidades de agitación se ajustan en consecuencia.

EJEMPLO 4:

PURIFICACIÓN DE FURINA RECOMBINANTE (rFURINA)

Este ejemplo proporciona métodos para filtrar y purificar rFurina. Los sobrenadantes de cultivo celular recogidos se filtraron primero en filtros de profundidad (filtros Cuno Zetaplus) para hacer que estuvieran libres de células y partículas, seguido de filtración de membrana con filtros de PVDF de 0,45 μm (PALL Fluorodyne II). El sobrenadante del cultivo celular filtrado que contiene la rFurina se concentró luego mediante ultrafiltración en casetes de PES UF de 10 K de Sartorius (Sartocon PESU 10 kDa) con factores de concentración que oscilan desde 10 hasta 50. Los

concentrados de Furina (oscilando la actividad de furina desde 290 hasta 1700 Unidades/ml) se almacenaron entonces en alícuotas a $<-60^{\circ}\text{C}$.

- En un esfuerzo por obtener una preparación de rFurina más homogénea para su uso en el proceso de maduración de VWF, se realizaron experimentos para purificar parcialmente la rFurina del sobrenadante del cultivo celular. Un reactivo de rFurina parcialmente purificado es más fácil de usar para pruebas de caracterización y liberación. También da como resultado una presencia reducida de proteínas de la célula huésped CHO en el proceso de maduración de VWF.
- Se desarrolló un procedimiento de purificación en una resina de intercambio aniónico que requería una conductividad de carga $<5\text{ mS/cm}$ (TA) para la unión eficaz de rFurina. Luego se realizó la elución como un procedimiento por etapas a una fuerza iónica de aproximadamente NaCl 500-300 mM, y durante la fase de examen, se aplicó un gradiente de elución de hasta NaCl 300 mM (véase el resumen en la tabla 24). El pH original de los tampones de 6,7 (TA) se aumentó hasta 7,5 para mejorar la unión de rFurina durante la carga, en particular a altas cargas de proteína y altas velocidades de flujo lineales (véase el resumen de tampones relevantes en la tabla 25). Los experimentos de purificación se realizaron en resinas de intercambio aniónico EMD TMAE (Merck) y CaptoQ (GE Healthcare) que diferían en la estabilidad del empaquetamiento y la velocidad de flujo máxima de funcionamiento. Los datos analíticos resumidos en la tabla 26 muestran que la rFurina puede concentrarse a partir del sobrenadante de cultivo celular hasta 362 veces con rendimientos que oscilan desde el 20 hasta el 71%. Las actividades de rFurina en los grupos de eluato fueron de entre 639 Unidades/ml y 27651 Unidades/ml, dependiendo de la carga aplicada. El nivel de impureza de CHO en el eluato se encontró en un intervalo de entre 10-134 ng de proteína de CHO/Unidad de rFurina, y velocidades de reducción de hasta 12,3 con un rendimiento ligeramente superior para la reducción de CHO encontrada para la resina CaptoQ.
- En resumen, la purificación de rFurina mediante cromatografía de intercambio aniónico demostró ser una opción para la concentración, lo que es importante para el almacenamiento del reactivo de rFurina a $<-60^{\circ}\text{C}$. Además, una ligera reducción de CHO de un factor de 3-12 es importante para reducir la concentración de proteína de CHO en la preparación de VWF.
- Tabla 24. Procedimiento aproximado para la purificación de rFurina en resina de intercambio aniónico. Para EMD TMAE (Merck), la velocidad de flujo aplicada fue de 150/75 cm/h, para CaptoQ (GE Healthcare) la velocidad de flujo fue 600/300

Etapas	Tampón	CV	Velocidad de flujo [cm/h]	Comentario
Equilibrado	tampón FEQ	10	150-600	
Carga	CCS diluido con EQ1	hasta 1200		Conductividad de la carga $\leq 5\text{ mS/cm}$
Lavado 1	Tampón EQ	hasta 50		Opcional; esta etapa se omitió en la carga de columna alta
Lavado 2	Mezcla de tampón EQ y tampón FEL	aprox. 10		
Elución escalonada	30% de FEL/70% de FEQ	14	75-300	
Elución en gradiente	100% de FEQ – 30% de FEL/70% de FEQ	14	75-300	Opcional; utilizado para experimentos de examen inicial
Acondicionamiento posterior	Diversos tampones (FEL, tampón de NaCl, tampón CIP)	15	n.d.	

- Tabla 25. Tampones para la purificación de furina en resina de intercambio aniónico

Tampón	Formulación	
Tampón de equilibrado (FEQ)	HEPES 50 mM, CaCl_2 1 mM, pH = 6,7-7,5 a TA	A altas cargas, se aumentó el pH de los tampones para mejorar la unión
Tampón de elución (FEL)	HEPES 50 mM, CaCl_2 1 mM, NaCl 1 M pH = 6,7-7,5 a TA	
Tampón NaCl	NaCl 2 M	
Tampón CIP	NaOH 0,5 M	

Tabla 26. Resumen de los experimentos de purificación relevantes de rFurina en resina de intercambio aniónico. El contenido total de proteínas se determinó utilizando un ensayo de Bradford. La velocidad de reducción de CHO se calcula como la proteína de CHO cargada dividida por la proteína de CHO total encontrada en el grupo de eluatos

		Carga		Eluato					
ID de ciclo		Carga de columna	Furina		Factor de conc.	Rendimiento	CHO		Comentario
		U de furina/ml de resina	U/ml	U/mg de proteína	Vol de carga/Vol de eluato	% de actividad de furina	ng/U de furina	Reducción	
011		2705	639	n.d.	32	36	134	3,6	TMAE; TA; elución, NaCl 500 mM
013		4016	2259	n.d.	33	57	51	3,0	TMAE; TA; elución, NaCl 400 mM
015		4403	2007	n.d.	41	46	50	3,8	TMAE; TA; elución, NaCl 300 mM
018		10635	2584	n.d.	65	37	41	6,5	TMAE; TA; elución, NaCl 300 mM
021		8684	3550	n.d.	126	20	59	5,5	TMAE; TA; elución, NaCl 300 mM
024		4151	903	n.d.	19	54	38	6,3	CaptoQ; TA; elución, NaCl 300 mM
025	E 1	15696	6185	n.d.		45	10	12,3	CaptoQ; TA; elución en gradiente
	E 2		1068	n.d.		12	n.d.	n.d.	
026	E 1	31316	10237	14138		51	8	10,1	CaptoQ; 4°C; elución en gradiente
	E 2		1868	n.d.		17	n.d.	n.d.	
028		32635	27651	10011	288	68	19	3,6	TMAE; 4°C; elución, NaCl 300 mM
029C		23682	12642	7789	176	71	14,4	6,9	CaptoQ; TA; elución, NaCl 300 mM
029T		23806	14922	2671	362	30	65,1	3,3	TMAE; TA; elución, NaCl 300 mM
033		20625	6843	4568	n.d.	35	n.d.	4,6	CaptoQ; TA; elución, NaCl 300 mM; conc. de UF/DF de carga

035	26244	13209	6967	n.d.	78	n.d.	1,9	TMAE; TA; elución, NaCl 300 mM; conc. de UF/DF de carga conc.
-----	-------	-------	------	------	----	------	-----	--

EJEMPLO 5:**5 CONCENTRACIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE rFURINA**

Este ejemplo describe otros métodos utilizados en la concentración y purificación (es decir, procesamiento posterior) de la rFurina a gran escala. Tales métodos de procesamiento incluyen ultrafiltración, diafiltración y cromatografía en capto-MMC, que se llevó a cabo en la producción de rFurina sustancialmente libre de proteína animal. También describe métodos para analizar la concentración de proteína, la actividad específica y la contaminación por la proteína y el ADN de la célula huésped.

Ultrafiltración. El sobrenadante (aproximadamente 800-1200 kg en las campañas de quimiostato, y aproximadamente 550-700 kg en las campañas de RFB) se separó de las células y se concentró mediante ultrafiltración hasta un volumen final de 35-45 l. Los parámetros y los puntos de referencia del sistema de ultrafiltración/diafiltración (UFS) durante la etapa de concentración se enumeran en la tabla 27.

Tabla 27. Parámetros de funcionamiento y puntos de referencia para la etapa de concentración

Parámetro	Punto de referencia
Temperatura de la recogida filtrada	10-15°C
Área de filtro	14 m ²
Presión de alimentación	0,9-1,5 bar
Presión del material retenido	0,7-1,2 bar
Presión del material permeado	0-0,1 bar
Presión transmembrana	0,7-1,0 bar
Velocidad de flujo específica cruzada (velocidad de flujo de alimentación)	300-600 l/h/m ²
Velocidad de flujo específica del material permeado	15-40 l/h/m ²
Factor de concentración	20-30
Tiempo de procesamiento	3-4 h

Diafiltración. Inmediatamente después de terminar la etapa de concentración, se inició la diafiltración del material retenido. Los parámetros y los puntos de referencia del UFS durante la etapa de diafiltración se enumeran en la tabla 28.

Tabla 28. Parámetros de funcionamiento y puntos de referencia para la etapa de diafiltración

Parámetro	Punto de referencia
Área de filtro	14 m ²
Presión de alimentación	0,9-1,5 bar
Presión del material retenido	0,7-1,2 bar
Presión del material permeado	0-0,1 bar
Presión transmembrana	0,7-1,1 bar
Velocidad de flujo específica cruzada (velocidad de flujo de alimentación)	300-600 l/h/m ²
Velocidad de flujo específica del material permeado	7-20 l/h/m ²
Conductividad objetivo	<2 mS/m ²
Velocidad de diafiltración ($V_{\text{material permeado}}/V_{\text{material retenido}}$)	4-5,5
Tiempo de procesamiento ¹⁾	0,75-1,25 h

Cuando la conductividad del material retenido ha disminuido por debajo de 2 mS/cm (determinada con la sonda de conductividad en línea del UFS), se finalizó esta etapa del procedimiento. Esta baja conductividad es necesaria para

garantizar una unión cuantitativa de la rFurina al gel cromatográfico en la etapa de purificación posterior. El producto diafiltrado se transfirió y se ajustó el valor de pH del producto diafiltrado a 6,0 añadiendo una disolución de ácido acético 1 M. El producto se almacenó a temperatura ambiente (TA) antes de aplicar a la columna Capto-MMC.

- 5 Cromatografía en Capto-MMC. Se usó el gel Capto-MMC, un intercambiador de cationes multimodal, para unir la rFurina y eliminar la gran mayoría de los contaminantes del producto diafiltrado. Después del equilibrado del gel cromatografía, se cargó el producto diafiltrado en la columna. Se instaló una cápsula de filtro de 0,22 µm para realizar una filtración en línea del producto diafiltrado. Las etapas cromatográficas adicionales se enumeran y se detallan en la tabla 29.

10

Tabla 29. Etapas de la cromatografía en Capto-MMC

	Etapas de cromatografía	Tampón/Producto	Velocidad de flujo lineal cm/h	Cantidad CV ¹⁾
1	Lavado con ácido	ES4 en línea diluido hasta ácido acético 0,2 M	300	1
2	Equilibrado	EP2	150	37
3	Absorción	35-45 l de producto diafiltrado	150	
4	Equilibrado	EP2	150	30
5	Lavado	WPF	150	10
6	Elución en gradiente	eluato de EL1/MMC	150	15
7	Elución II	eluato II de EL2/MMC	150	10
8	Regeneración	ES4	150	10
9	Regeneración	SHD	150	10

¹⁾ CV = volumen de columna: volumen de la resina empaquetada en la columna de cromatografía

- 15 En el procesamiento posterior, no se observaron problemas. Las etapas posteriores (filtración, UF, DF) podrían llevarse a cabo en las mismas condiciones utilizadas para las recogidas del cultivo de quimiostato. Pudieron obtenerse rendimientos totales medios de actividades de rFurina del 91% (campaña ORFU06002), el 66% (campaña ORFU07001) y el 84% (campaña ORFU07002). El único cambio menor viene dado por el hecho de que el volumen inicial para la etapa de UF es algo menor en comparación con el cultivo continuo. Pero este cambio no tiene efecto en la calidad del producto purificado (véanse los datos sobre la actividad total, el ADN de la célula huésped, la proteína de la célula huésped; véase la tabla 30).

20

- Los valores medios de las tres campañas para la proteína de la célula huésped y el contenido de ADN de la célula huésped revelan valores máximos medios bastante bajos de 8,55 µg/ml (que oscila desde 2,2 hasta 10,4 µg/ml) y 13,48 ng/ml (que oscila desde 0,0 hasta 23,9 ng/ml), respectivamente (véase la tabla 30). La etapa cromatográfica fue capaz de reducir la contaminación específica a valores medios máximos bajos de 0,35 ng de proteína de CHO/U de actividad de rFurina (que oscila desde 0,13 hasta 0,52 ng de proteína de CHO/U) y 0,148 pg de ADN de la célula huésped/U de actividad de rFurina (que oscila desde 0,0 hasta 0,365 pg de ADN/U de actividad de rFurina).

25

30 Tabla 30. Resultados de la impureza de la cromatografía en Capto-MMC - Comparación de campañas

Campaña	Contenido de proteína de CHO	Proteína de CHO/actividad de rFurina	Contenido de ADN de la célula huésped	ADN de la célula huésped/actividad de rFurina
	µg/ml	ng/U	ng/ml	pg/U
ORFU06002	8,55	0,22	1,66	0,059
ORFU07001	3,50	0,35	2,54	0,031
ORFU07002	2,36	0,026	13,48	0,148

Caracterización de furina. La calidad y la funcionalidad de rFurina se evaluaron siguiendo métodos bioquímicos/biofísicos (tabla 31).

35 Tabla 31. Métodos analíticos para rFurina

Método	Objetivo	Comentario
Escisión del sustrato fluorescente	Actividad enzimática	Sustrato de bajo peso molecular
Prueba de uso de furina	Actividad enzimática, eficacia de maduración	Sustrato rVWF

SDS-PAGE	Composición de proteína	Ensayo de inmunotransferencia de tipo Western
IEF	Composición de proteína	Tinción de Coomassie, ensayo de inmunotransferencia de tipo Western
RP-HPLC	Composición de proteína	Huella dactilar de proteína

Ensayo de actividad de furina. Se sometieron a prueba los lotes de rFurina purificada (grupos de eluato de Capto-MMC) para determinar la actividad enzimática de furina. El sustrato es un péptido sintético corto que contiene la secuencia de reconocimiento dibásica unida a un grupo amino-metil-cumarina (AMC) fluorescente, que se libera después de la escisión (BOC-RVRR-AMC). El grupo fluorogénico liberado puede detectarse mediante excitación a 380 nm y la medición posterior de la luz emitida a 435 nm. Una unidad de actividad se define como la liberación de 1 pMol de AMC por minuto a 30°C.

Dependiendo de la eficacia de la fermentación y la purificación, los valores medidos de la actividad de rFurina estuvieron en el intervalo de aproximadamente 10000 U/ml hasta más de aproximadamente 100000 U/ml, con un valor medio de aproximadamente 69000 U/ml (tabla 32, tabla 33 y tabla 34). Se observó un aumento de la actividad de rFurina para las campañas en modo RFB, especialmente cuando se comparan los valores medios de la campaña de quimiostato ORFU06002 (47737 U/ml) con los valores medios de las campañas de RFB ORFU07001 (77653 U/ml) y ORFU07002 (93178 U/ml). (En general, la actividad de rFurina osciló entre aproximadamente 10000 y más de 100000 U/ml; todos los datos no mostrados).

La actividad específica de furina se expresa como la U de actividad/μg de proteína (véanse la tablas 32-34). La actividad específica media para la campaña ORFU06002 fue 269 U/μg de proteína, que aumentó hasta 500 U/μg para ORFU07001 y 563 U/μg para ORFU07002, respectivamente. (En general, la actividad específica osciló desde 124 hasta 620 U/μg de proteína; datos no mostrados). Por tanto, la actividad específica se duplicó para las dos campañas de RFB, un resultado de la mayor actividad enzimática de la rFurina en RFB en comparación con los lotes producidos en el modo de quimiostato.

Tabla 32. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU06002

Lote de furina, en modo de quimiostato	Actividad de furina	Contenido en proteína	Actividad específica de rFurina
	[U/ml]	[μg/ml]	[U/μg]
ORFUCHR06002MMC01	28231	148	190,8
ORFUCHR06002MMC02	16307	162	124,3
ORFUCHR06002MMC03	44854	174	257,8
ORFUCHR06002MMC04	39102	148	264,2
ORFUCHR06002MMC05	71871	236	304,5
ORFUCHR06002MMC06	44292	142	311,9
ORFUCHR06002MMC07	68728	155	443,4
ORFUCHR06002MMC08	68510	271	252,8
Valor medio	47737	180	269

Tabla 33. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU07001

Lote de furina, en fermentación semicontinua repetida	Actividad de furina	Contenido en proteína	Actividad específica de rFurina
	[U/ml]	[μg/ml]	[U/μg]
ORFUCHR07001MMC01	77090	151	510,5
ORFUCHR07001MMC02	68450	112	611,2
ORFUCHR07001MMC03	87420	231	378,4
Valor medio	77653	165	500

Tabla 34. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU07002

Lote de furina, en fermentación discontinua repetida	Actividad de furina	Contenido en proteína	Actividad específica de rFurina
	[U/ml]	[μg/ml]	[U/μg]

ORFUCHR07002MMC01	91200	162	563,0
ORFUCHR07002MMC02	96400	160	602,5
ORFUCHR07002MMC03	95020	173	549,2
ORFUCHR07002MMC04	85690	190	451,0
ORFUCHR07002MMC05	102670	174	590,1
ORFUCHR07002MMC06	88090	142	620,4
Valor medio	93178	167	563

Actividad de prueba de uso de furina. La prueba de uso está diseñada para cuantificar la eficacia de rFurina para procesar pro-VWF para dar rVWF maduro. La eficacia de maduración se expresa como la cantidad de unidades de furina requeridas para la maduración de 1 unidad de antígeno de VWF (U de furina/U de VWF). El sustrato es una preparación de pro-VWF/VWF que se ha purificado a escala piloto según el procedimiento de fabricación actual, pero omitiendo la maduración de furina y la etapa de purificación final en Superose 6. La concentración de sustrato de rVWF fue de 100 U Ag/ml (F8HL_24_01UF02-R).

Se sometieron a prueba cuatro diluciones de la muestra en un tubo Eppendorf de 1 ml para cubrir concentraciones específicas de furina, por ejemplo, 0,25-2,0 U/U VWF. El tampón de reacción y la dilución fue HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,0, y el experimento de maduración se realizó durante 16 horas a 37°C bajo agitación ligera. Tras la incubación, la reacción enzimática se detiene mediante la adición de SDS-tampón de muestra y calentando las muestras durante 5 minutos a > 90°C. Las muestras se analizan luego mediante SDS-PAGE en geles al 8% usando tinción con plata de los polipéptidos separados. Entonces se notifica la actividad específica de furina requerida para conseguir una eficacia de maduración de > 95% tal como se evalúa según la inspección visual de los geles (la banda pro-VWF debe representar menos del 5% en comparación con la banda de VWF maduro) y se usa como atributo de calidad de la rFurina sometida a prueba.

Tabla 35. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU06002

Lote de furina, en modo de quimiostato	Actividad de furina	Actividad de prueba de uso	Grado de maduración
	[U/ml]	[U/U]	[%]
ORFUCHR06002MMC01	28231	0,7	>95
ORFUCHR06002MMC02	16307	0,4	>95
ORFUCHR06002MMC03	44854	1,1	>95
ORFUCHR06002MMC04	39102	1,3	>95
ORFUCHR06002MMC05	71871	1,0	>95
ORFUCHR06002MMC06	44292	1,0	>95
ORFUCHR06002MMC07	68728	1,0	>95
ORFUCHR06002MMC08	68510	1,0	>95
Valor medio	47737	0,58	>95

Tabla 36. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU07001

Lote de furina, en fermentación discontinua repetida	Actividad de furina	Actividad de prueba de uso	Grado de maduración
	[U/ml]	[U/U]	[%]
ORFUCHR07001MMC01	77090	0,5	>95
ORFUCHR07001MMC02	68450	0,5	>95
ORFUCHR07001MMC03	87420	0,5	>95
Valor medio	77653	0,5	>95

Tabla 37. Grupo de eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU07002

Lote de furina, en fermentación discontinua repetida	Actividad de furina	Actividad de prueba de uso	Grado de maduración
	[U/ml]	[U/U]	[%]

ORFUCHR07002MMC01	91200	0,5	>95
ORFUCHR07002MMC02	96400	0,5	>95
ORFUCHR07002MMC03	95020	0,5	>95
ORFUCHR07002MMC04	85690	0,3	>95
ORFUCHR07002MMC05	102670	0,6	>95
ORFUCHR07002MMC06	88090	1,0	>95
Valor medio	93178	0,6	>95

Se encontró una actividad de maduración buena y consistente para pro-VWF para todos los lotes de rFurina sometidos a prueba. Los valores medios de las campañas están por debajo de 1,0 U de furina/U de VWF:Ag, y el grado de maduración supera el 95% en todos los casos (tablas 35-37). Las actividades de maduración de todos los lotes de rFurina son comparables y, en referencia a los valores medios calculados de las campañas ORFU06002, ORFU07001 y ORFU07002, casi no pueden encontrarse diferencias entre la rFurina producida en modo de quimiostato y en modo RFB.

SDS-PAGE de furina y tinción con plata. Se realizó SDS-PAGE al 8% con tinción de plata y análisis de inmunotransferencia de tipo Western para todos los lotes de rFurina para garantizar una calidad constante y visualizar el grado de impureza. Tal como se observa en la figura 12, los patrones de bandas de los eluatos de Capto-MMC de la campaña ORFU06002 y ORFU07002 se correlacionan en un alto grado; todas las muestras muestran una banda prominente de furina a aproximadamente 60 kDa. Una tendencia a un peso molecular ligeramente inferior de las bandas de furina es visible en muestras de la campaña ORFU06002 de los lotes MMC01 a MMC08 (figura 12, carriles 1-8). Las muestras de esos lotes se desglicosilaron con el efecto de que esta tendencia ya no fue visible en la posterior SDS-PAGE con tinción de plata (datos no mostrados), lo que apoya el supuesto de que durante la campaña ORFU06002, la rFurina se glicosiló de manera ligeramente diferente o en menor grado en el transcurso de la fermentación en curso. Esta tendencia no se apreció en la campaña RFB ORFU07002, lo que sugiere una glicosilación constante de la rFurina durante toda la campaña. Las impurezas en los lotes de ORFU06002 y ORFU07002 son casi completamente iguales; sin embargo, las muestras de la campaña en modo RFB ORFU07002 muestran bandas menos intensas en la región de 40 kDa, los polipéptidos que fueron particularmente enriquecidos de manera fuerte en muestras de la campaña ORFU06002.

SDS-PAGE - Inmunotransferencia de tipo Western. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western para todas las muestras se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti-furina (figura 13). La banda prominente a ~60 kDa se puede identificar como la banda de furina, y se encuentra en todas las muestras. La comparabilidad de las muestras es muy alta. Las variaciones leves en la intensidad de la banda se deben a la diferente concentración de furina en las muestras. En general, el análisis de SDS-PAGE remarca la comparabilidad de la rFurina producida en modo quimiostato y RFB.

Para apoyar la SDS-PAGE convencional, se realizó el isoelectroenfoco (IEF) en muestras de las campañas ORFU06002 y ORFU07002. Se realizó el IEF entre pH 7,0 y pH 3,0, utilizando IEF vertical. Los polipéptidos se visualizaron con tinción de Coomassie y análisis de inmunotransferencia de tipo Western. El IEF y la posterior inmunotransferencia de tipo Western de muestras de rFurina de la campaña ORFU06002 proporcionaron patrones de bandas específicos para furina (véase figura 14). Se identificaron hasta siete bandas separadas en la región de pH 4,5 a pH 5,5, con al menos cinco bandas presentes en todas las muestras.

El IEF de muestras de la campaña ORFU07002 se llevó a cabo utilizando tinción de Coomassie y análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la visualización. La tinción de Coomassie revela el patrón de banda específico mostrando todas las muestras un mínimo de cinco bandas separadas en el intervalo de pH 4,5 a pH 5,5, y se pueden identificar hasta ocho bandas (véase la figura 15, carril 3).

El análisis por inmunotransferencia de tipo Western (véase figura 16) corrobora estos resultados, no mostrando algunas muestras todas las bandas visibles en el gel de Coomassie (véase la figura 17), probablemente debido a la transferencia incompleta de las proteínas del gel a la membrana de inmunotransferencia.

HPLC de fase inversa de furina. Las muestras de las campañas ORFU06002 y ORFU07003 (eluatos de Capto-MMC) se sometieron a prueba con C4 RP-HPLC para establecer un patrón de huellas para rFurina. Se compararon los patrones de picos de las muestras de las dos campañas (véanse la figura 17 y la figura 18).

Los cromatogramas de todas las muestras sometidas a prueba muestran un pico principal característico en un tiempo de retención de aproximadamente 13 min, que puede asignarse a la furina. Las alturas de pico se correlacionan bien con la concentración de furina en las muestras. Otras impurezas de proteínas pueden observarse como picos minoritarios en el intervalo de 8 min a 17 min. Todas las muestras de la campaña ORFU07002 muestran significativamente menos picos y menores para las impurezas que aquellos de ORFU06002. Este hecho concuerda con los resultados de SDS-PAGE, ya que en la campaña ORFU07002 en modo RFB, se encontraron un menor número y una menor cantidad de impurezas.

Los datos analíticos obtenidos de los métodos de caracterización discutidos anteriormente demuestran una muy buena comparabilidad de la rFurina producida tanto en modo de quimiostato como en modo RFB. No pudieron detectarse diferencias importantes en la calidad de rFurina a partir de los datos disponibles, sin embargo los lotes de rFurina producidos en modo RFB mostraron una mayor actividad específica y menos impurezas en comparación con la producción en modo de quimiostato. La etapa cromatográfica explica el muy bajo contenido de proteína de la célula huésped y de ADN de la célula huésped en la sustancia de fármaco a granel (BDS). Al menos un procedimiento de producción completo que consiste en una fermentación RFB y todo el procesamiento posterior (filtración, UF/DF, cromatografía de Capto-MMC) puede ser más fácil de implementar para la producción comercial de rFurina, por ejemplo en sistemas de biorreactor de un solo uso (SUB).

EJEMPLO 6:

PRUEBAS DE SEGURIDAD, ESTERILIDAD Y ESTABILIDAD

Este ejemplo describe las pruebas de seguridad, esterilidad y estabilidad que se realizan para determinar y mantener la calidad del banco de células CHO. Las pruebas sobre esterilidad/micoplasma deben realizarse según los requisitos de la Directriz ICH Q5D. La calidad del banco de células debe verificarse mediante la determinación de la viabilidad promedio y la densidad celular de las células descongeladas y la posterior velocidad de crecimiento de los cultivos.

Las células se sometieron a prueba para determinar la seguridad viral (tabla 38), la estabilidad genética (tabla 39) y la identidad (tabla 40). Se encontró que las células eran estériles, libres de micoplasma, libres de agentes extraños, libres de retrovirus, negativas para el virus MVM, negativas para virus adventicios, negativas para virus de roedores, libres de virus porcinos y bovinos, y libre del virus Cache Valley (CW).

Los bancos de células se examinaron con respecto a la proporción productor/no productor mediante análisis de FACS. También se sometieron a prueba para determinar la estabilidad a largo plazo (capacidad para producir furina durante un periodo de tiempo). Además, la furina secretada producida en condiciones libres de suero debe investigarse con respecto a las isoformas generadas. Todos los datos deben indicar que se puede lograrse un crecimiento estable y la producción de furina se puede lograrse utilizando estos bancos de células.

Las células de MCB/WCB deben mostrar crecimiento estable y expresión de furina a lo largo de todo el procedimiento de producción.

Tabla 38. Programa de seguridad viral

Prueba	MCB	WCB	MEPC
Virus adventicios <i>in vitro</i> (células CHO, A9, Vero, MRC-5)	x	x	x
Virus adventicios <i>in vivo</i> (en ratones lactantes, ratones adultos, cobayas y huevos embrionados)	x	(x)	x
Virus de roedores Prueba MAP con exposición a LCMV	x	---	---
Virus de roedores HAP	x	---	---
Virus de roedores MMV (ensayo <i>in vitro</i>)	x	---	x
Retrovirus EM (examen de microscopía electrónica de transmisión)	x	---	x
Retrovirus Ensayo de infectividad retroviral con punto final pertinente	x	---	x
Retrovirus Ex S+L- (detección <i>in vitro</i> de retrovirus xenotrópicos mediante enfoque con Mink S+L)	x	---	x
Retrovirus/cocultivo Detección de retrovirus infecciosos mediante cocultivo con células HEK 293 (5 pases)	---	---	x
Virus bovino: Detección de contaminantes virales en suero bovino según los requisitos CMPC y US 9CFR	x	---	---

Virus porcino: Ensayo <i>in vitro</i> , detección de contaminantes virales porcinos utilizando células indicadoras de PPK según 9 CFR	x	---	---
PCR, poliomavirus bovino	x	---	x
PCR en tiempo real del virus Cache Valley (CW)	x	---	x

(x) Las pruebas virales no han de realizarse en WCB a partir del cual se prepararon MEPC

Tabla 39. Programa de estabilidad genética

5

Prueba	MCB	WCB	MEPC
Productividad: Ensayo de actividad de furina	x	x	x
Secuenciación	x	---	x
PCR cuantitativa (número de copias del gen)	x	---	x
Transferencia de tipo Southern	x	---	x
Transferencia de tipo Northern	x	---	x

Tabla 40. Programa de identidad

Prueba	MCB	WCB	MEPC
Análisis de isoenzima	x	x	x

- 10 La presente invención se ha descrito en lo que se refiere a realizaciones particulares encontradas o propuestas para comprender modos preferidos para la práctica de la invención. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, en vista de la presente invención, pueden realizarse numerosas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares a modo de ejemplo sin apartarse del alcance pretendido de la invención. Por tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas las variaciones equivalentes que se encuentran dentro del alcance de la
- 15 invención tal como se reivindica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende furina recombinante sustancialmente libre de proteína animal (rFurina) que tiene una actividad específica de al menos 300 U/μg de proteína, en la que la composición comprende ADN de la célula huésped en una concentración de entre aproximadamente 0 y 0,4 pg de ADN/U de actividad de furina, en la que la actividad de rFurina se mide en un péptido sintético corto que contiene la secuencia de reconocimiento dibásica unida a un grupo amino-metil-cumarina (AMC) fluorescente, que se libera después de la escisión (BOC-RVRR-AMC), por lo que una unidad de actividad se define como la liberación de 1 pMol de AMC por minuto a 30°C.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende furina recombinante con una actividad específica de al menos 350 U/μg de proteína.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, que comprende furina recombinante con una actividad específica de al menos 400 U/μg de proteína.
4. Composición según la reivindicación 1, que comprende furina recombinante con una actividad específica de al menos 450 U/μg de proteína.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1, que comprende furina recombinante con una actividad específica de al menos 500 U/μg de proteína.
6. Composición según la reivindicación 1, que comprende furina recombinante con una actividad específica de al menos 600 U/μg de proteína.
- 25 7. Método para preparar la composición según la reivindicación 1, que comprende la etapa de hacer crecer una célula huésped transformada o transfectada con un polinucleótido que codifica para furina en medio libre de suero en un procedimiento de cultivo de realimentación discontinua en condiciones que permiten la secreción de la furina en el medio, unir la furina secretada en una resina de intercambio catiónico multimodal; y recuperar la furina secretada de la resina de intercambio catiónico multimodal.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, que comprende la etapa de adaptar la célula huésped para que crezca en medio con concentraciones de suero cada vez más bajas hasta que todo el suero se elimine del medio.
- 35 9. Método según la reivindicación 7, que comprende transferir la célula huésped desde crecimiento en medio que comprende suero hasta crecimiento en medio libre de suero.
10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que la célula huésped es una célula CHO.
- 40 11. Método de uso de la composición según la reivindicación 1, que comprende la etapa de poner en contacto una pro-proteína que comprende un sitio de escisión de furina con la composición en condiciones para escindir un pro-péptido de la pro-proteína para formar una proteína madura.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la proteína madura es el factor von Willebrand.
- 45 13. Método según la reivindicación 11, en el que la proteína madura es el factor VIII.
14. Composición según la reivindicación 1, en la que la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

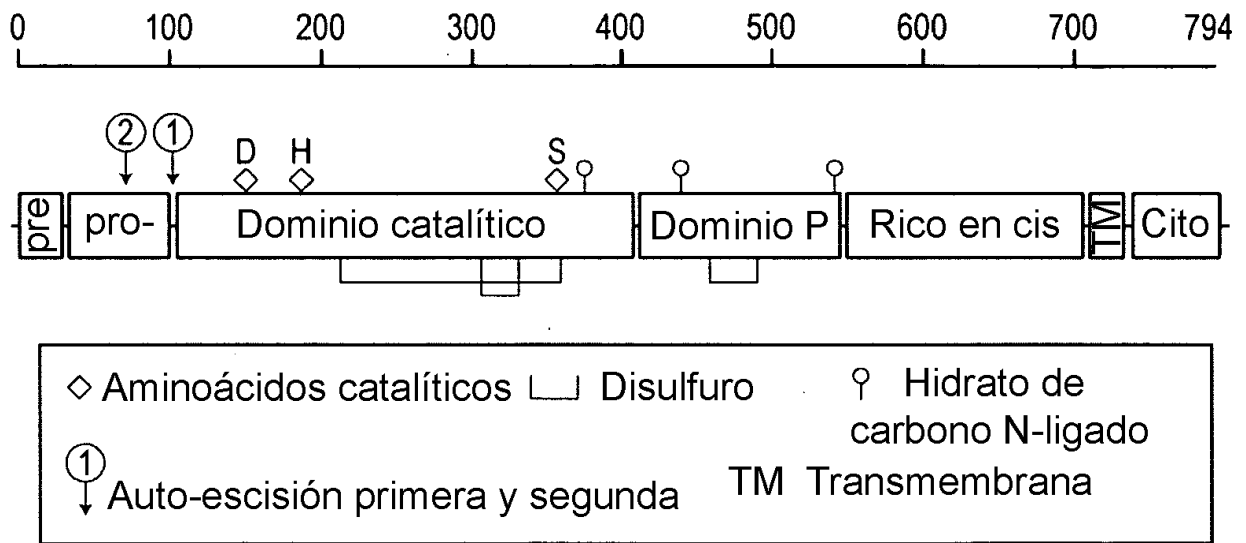


FIG. 1

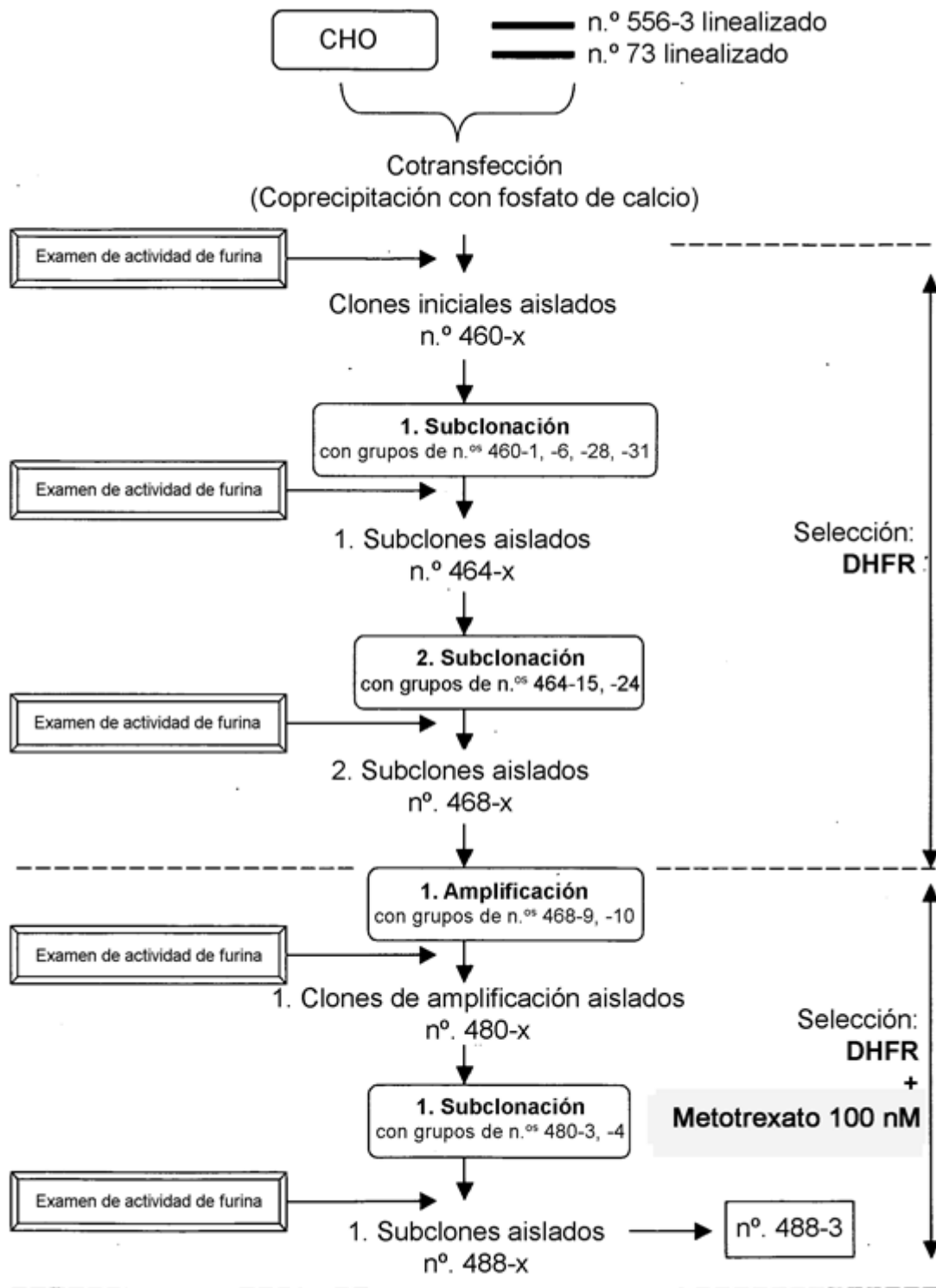
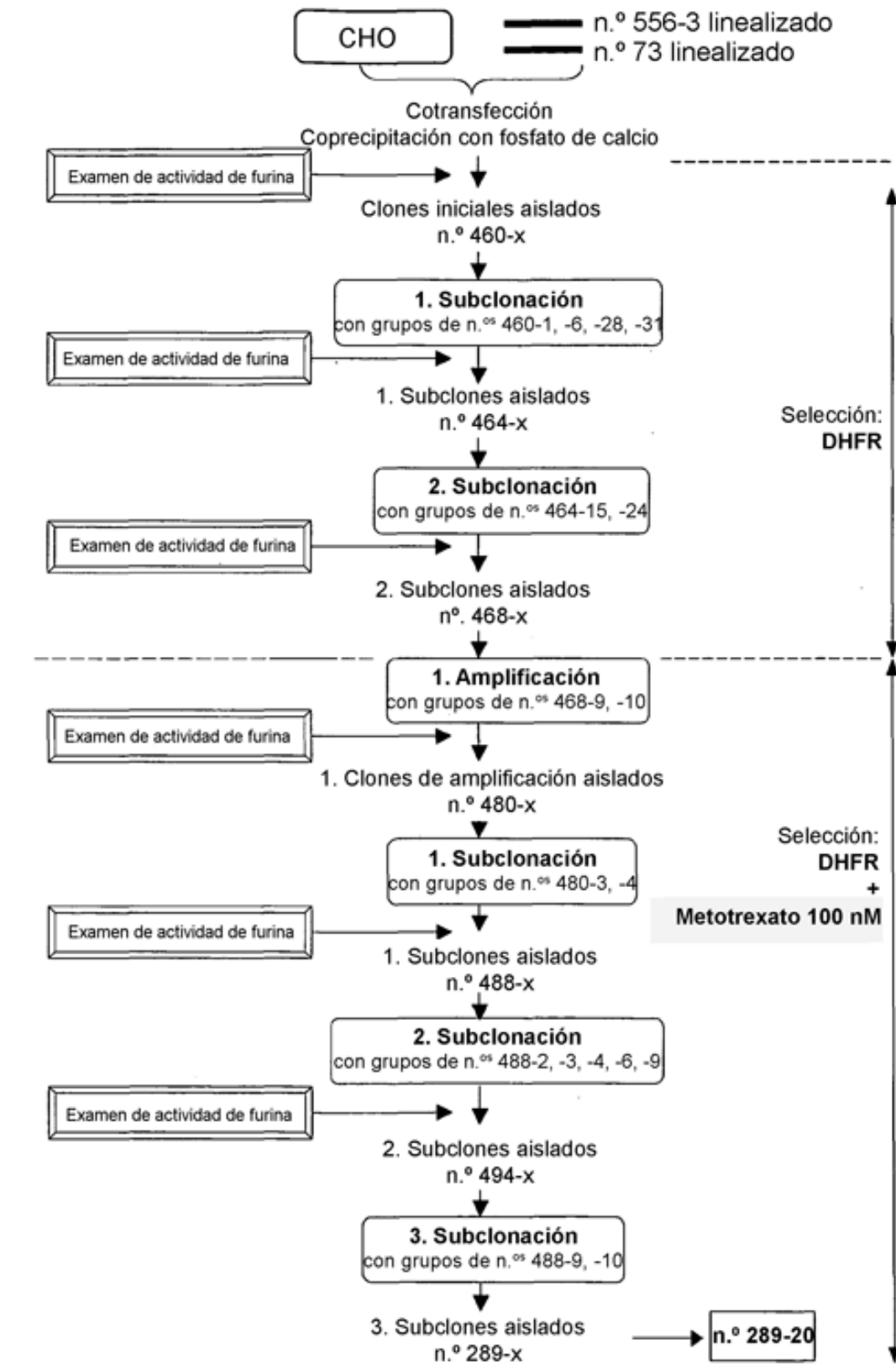
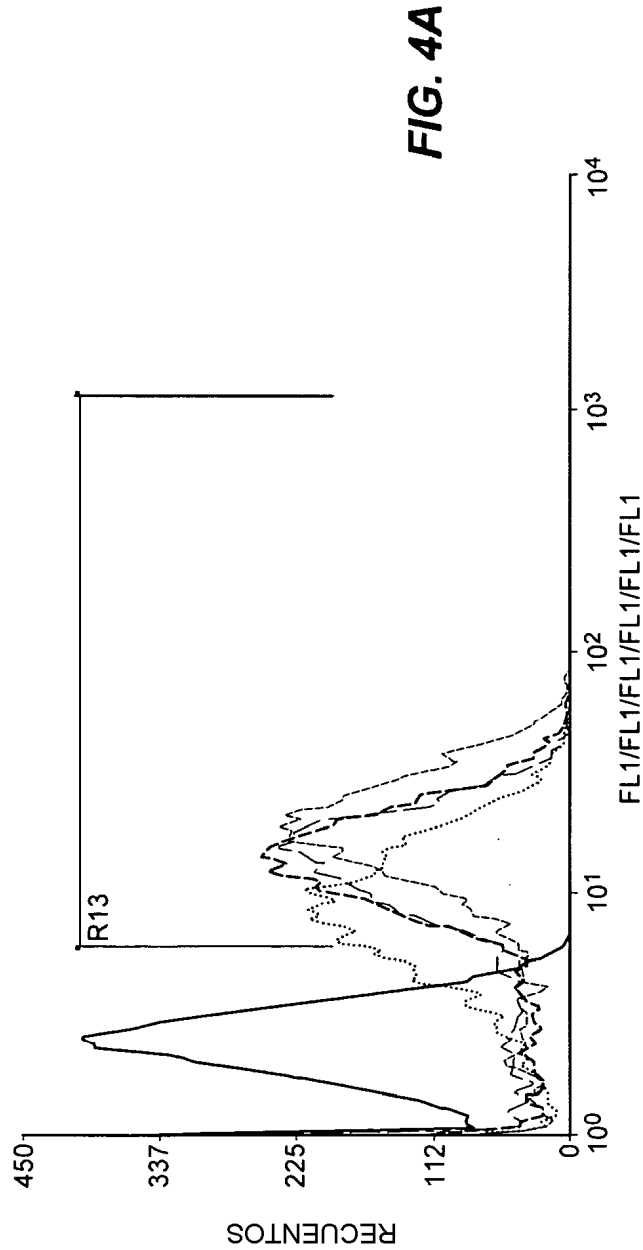


FIG. 2





Comentarios de los resultados de FACS

Población celular	Código de muestra	% positivo para furina	Media	Mediana
Control	CHO DUKX DXB11neg	0.25	2.52	2.37
PMCB nº 01	RE06-076-07	74.06	12.55	11.55
Muestra irrelevante	RE06-077-07	81.02	17.59	15.96
PMCB nº 04	RE06-079-07	80.74	13.71	12.41
Muestra irrelevante	SK06-63-28	67.89	10.22	8.35

FIG. 4B

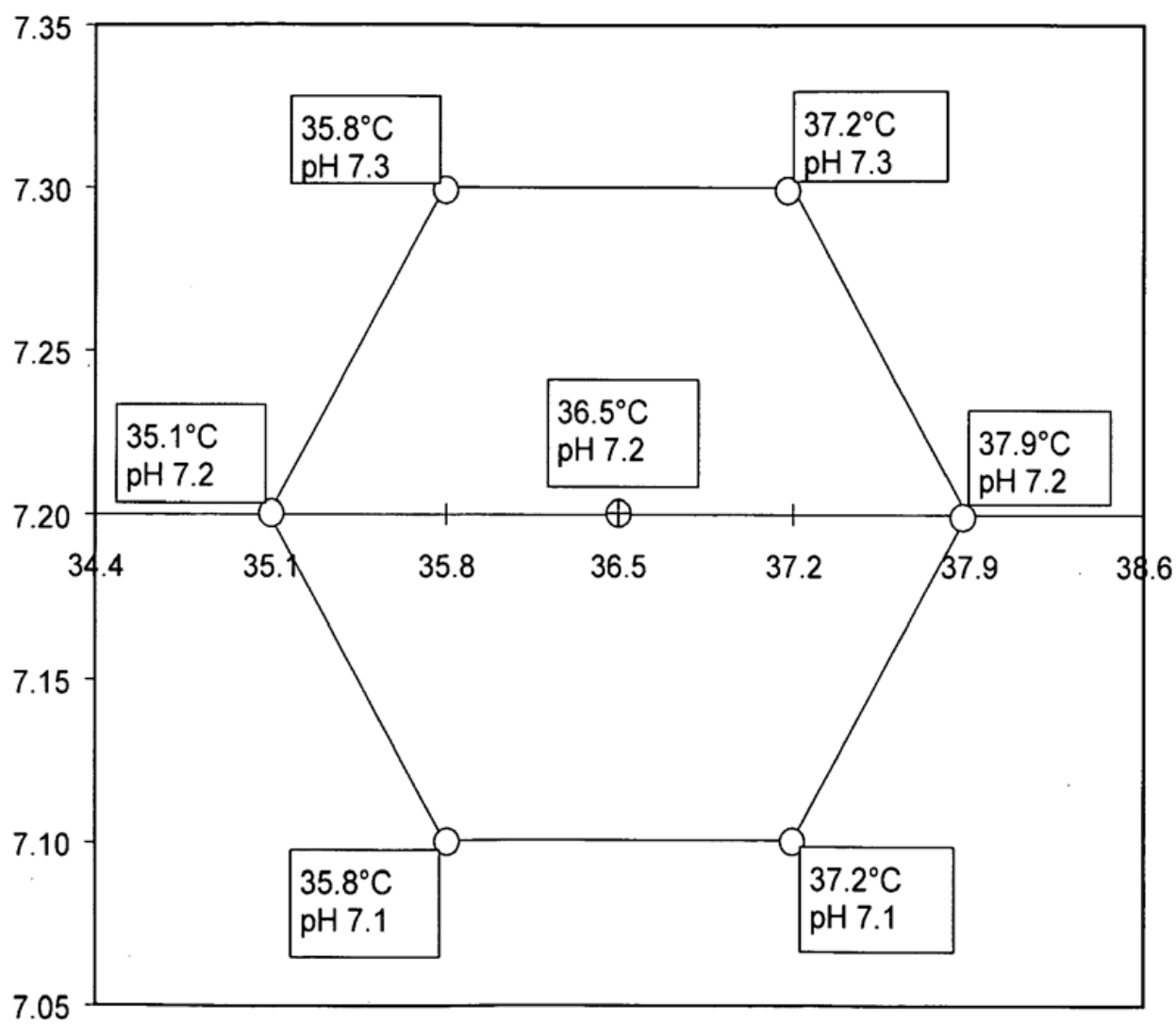


FIG. 5

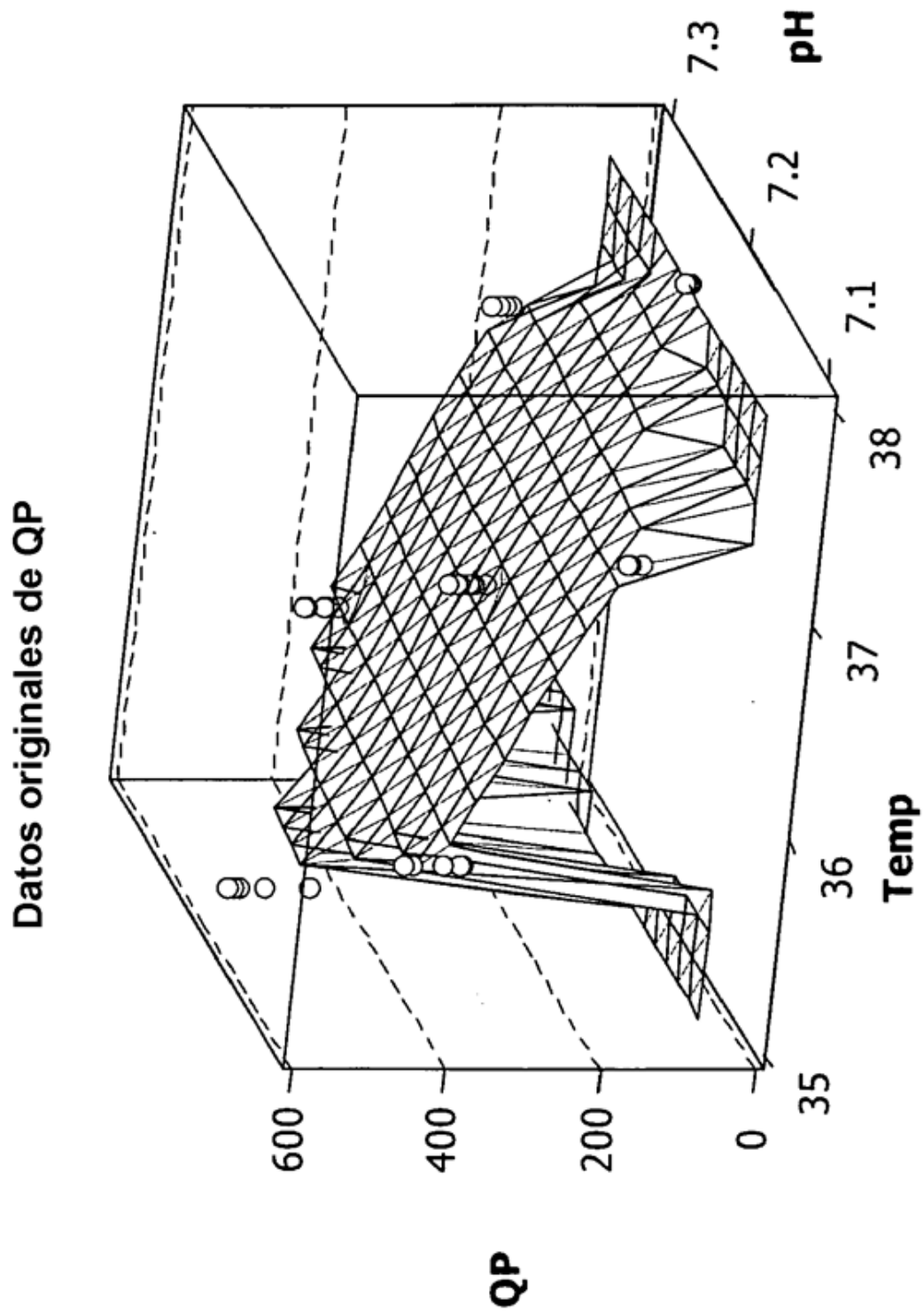


FIG. 6

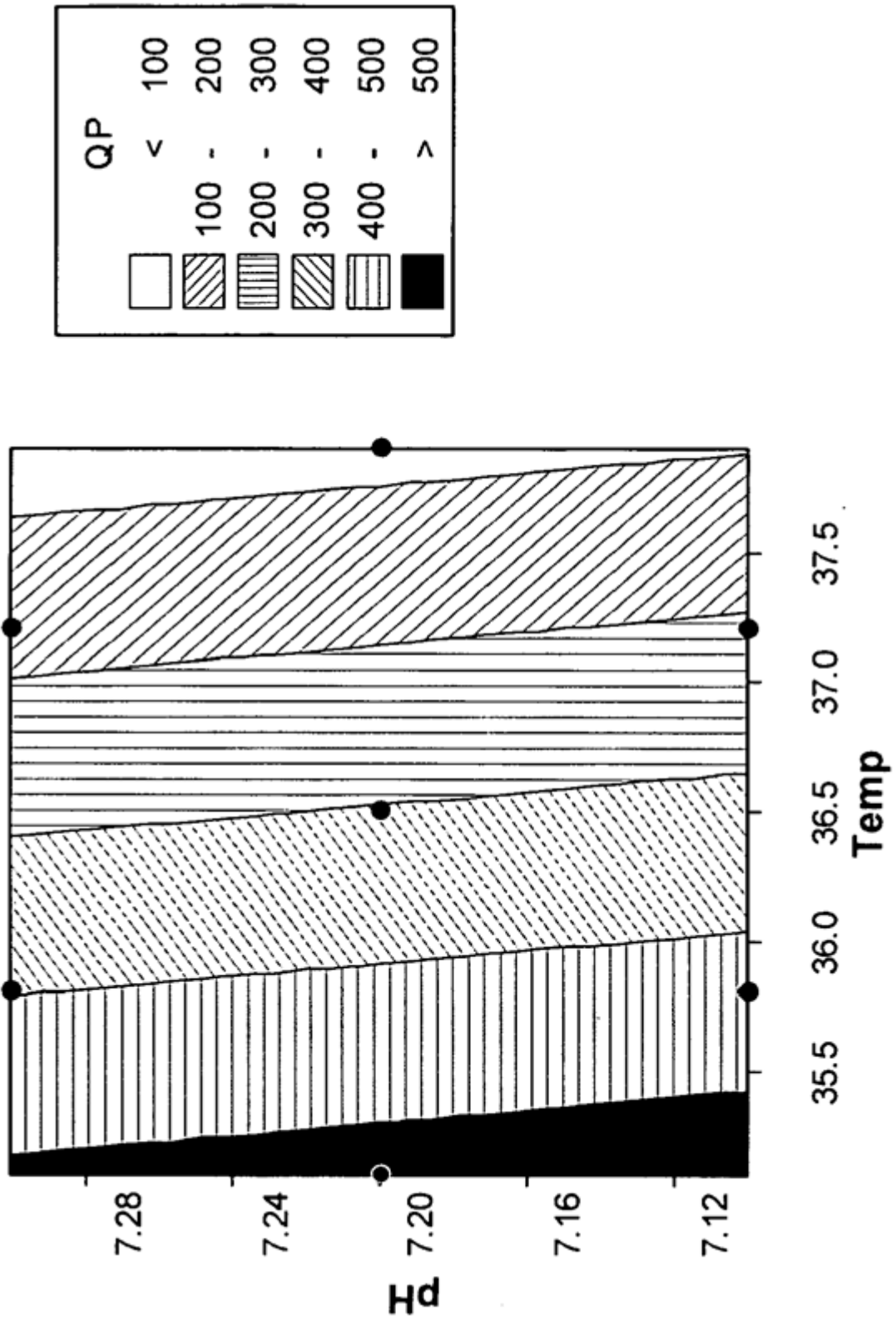


FIG. 7

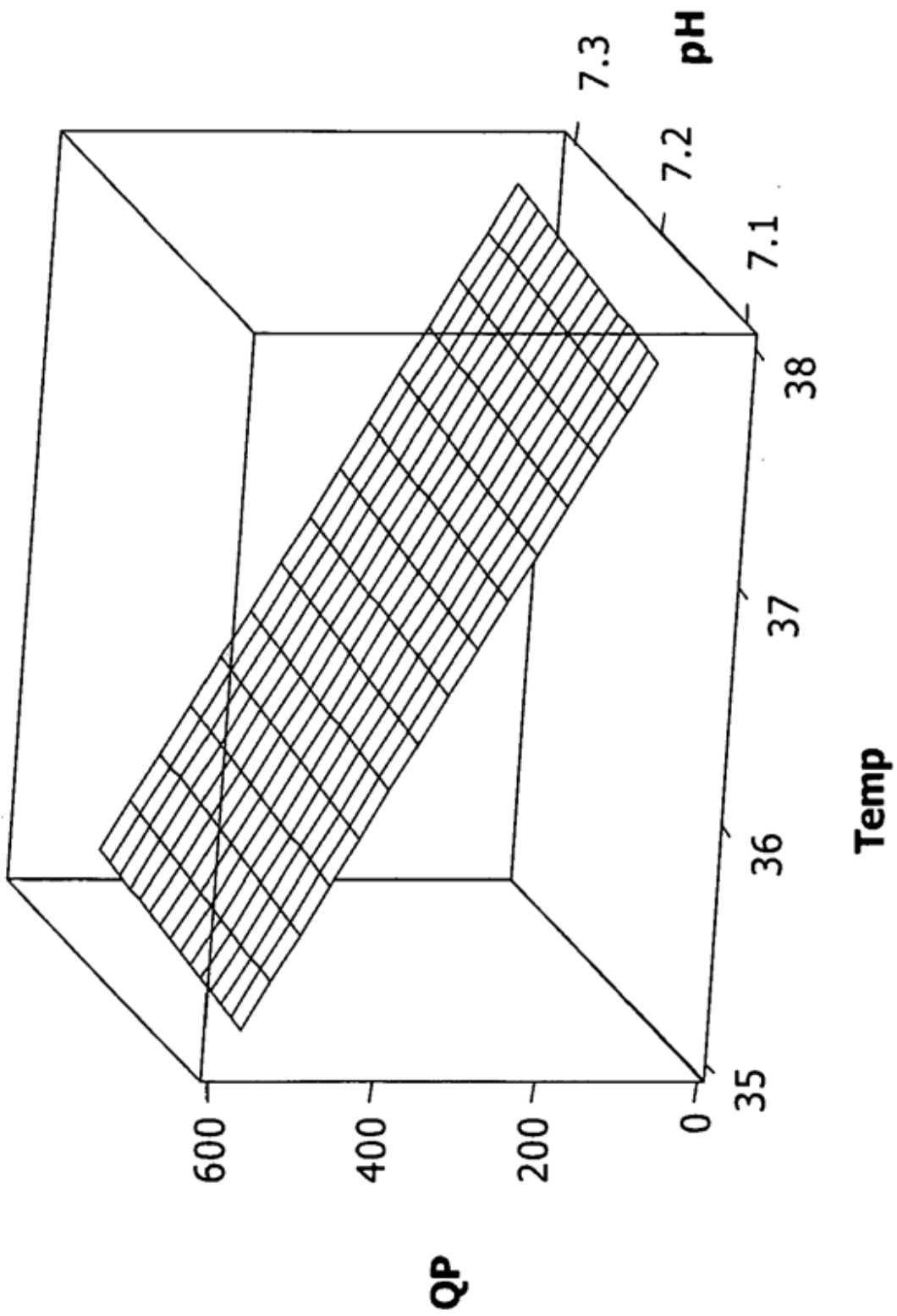


FIG. 8

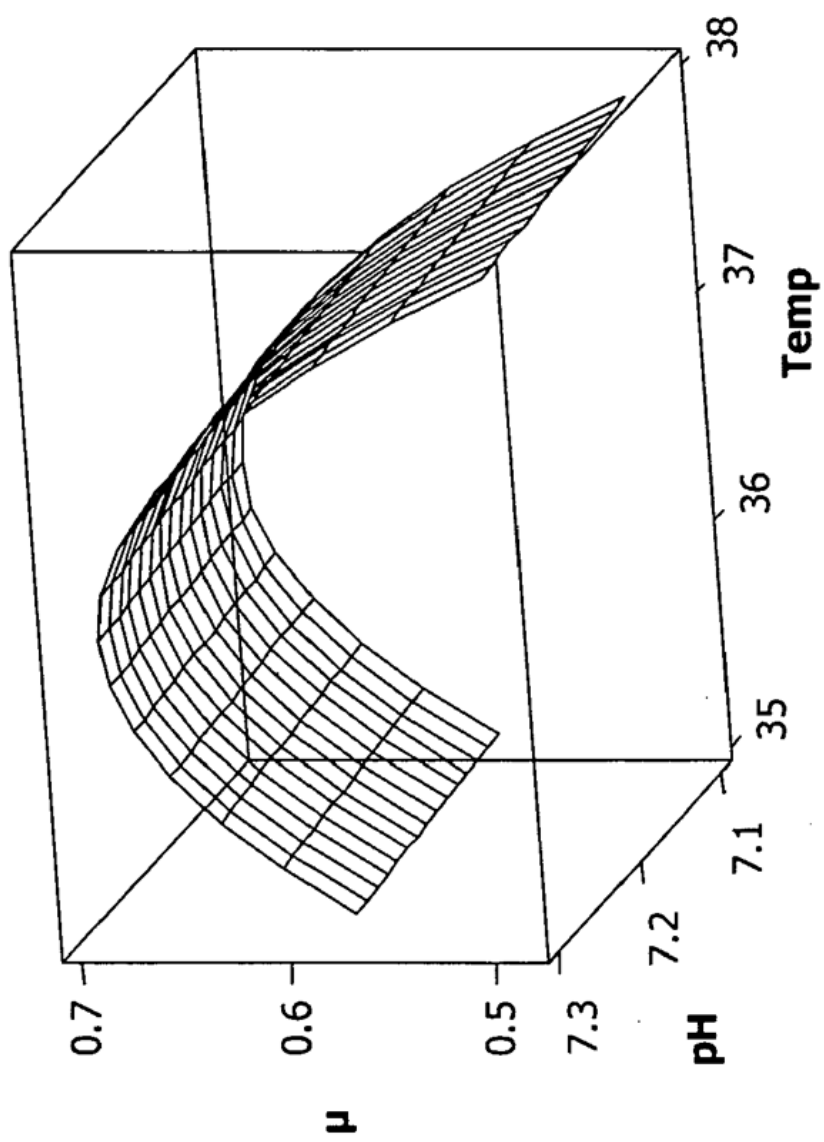


FIG. 9

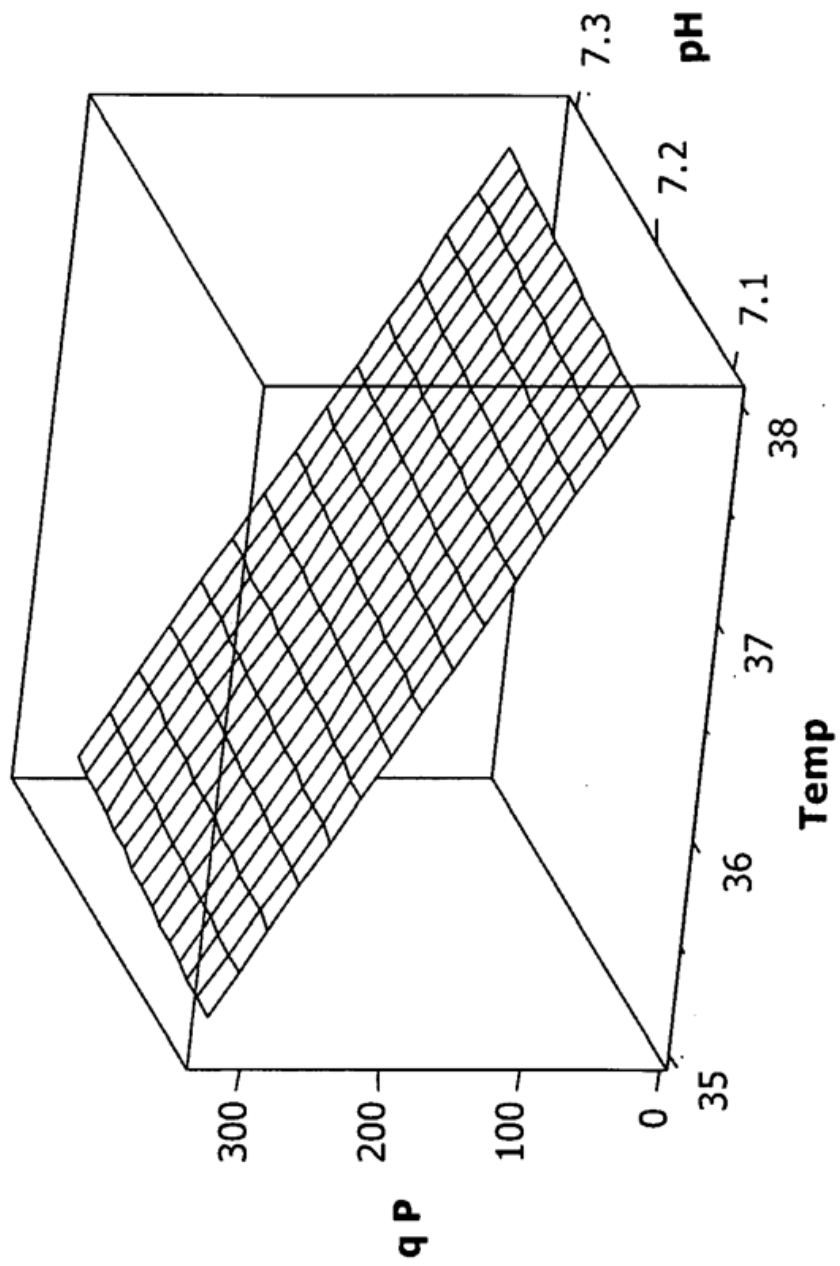


FIG. 10

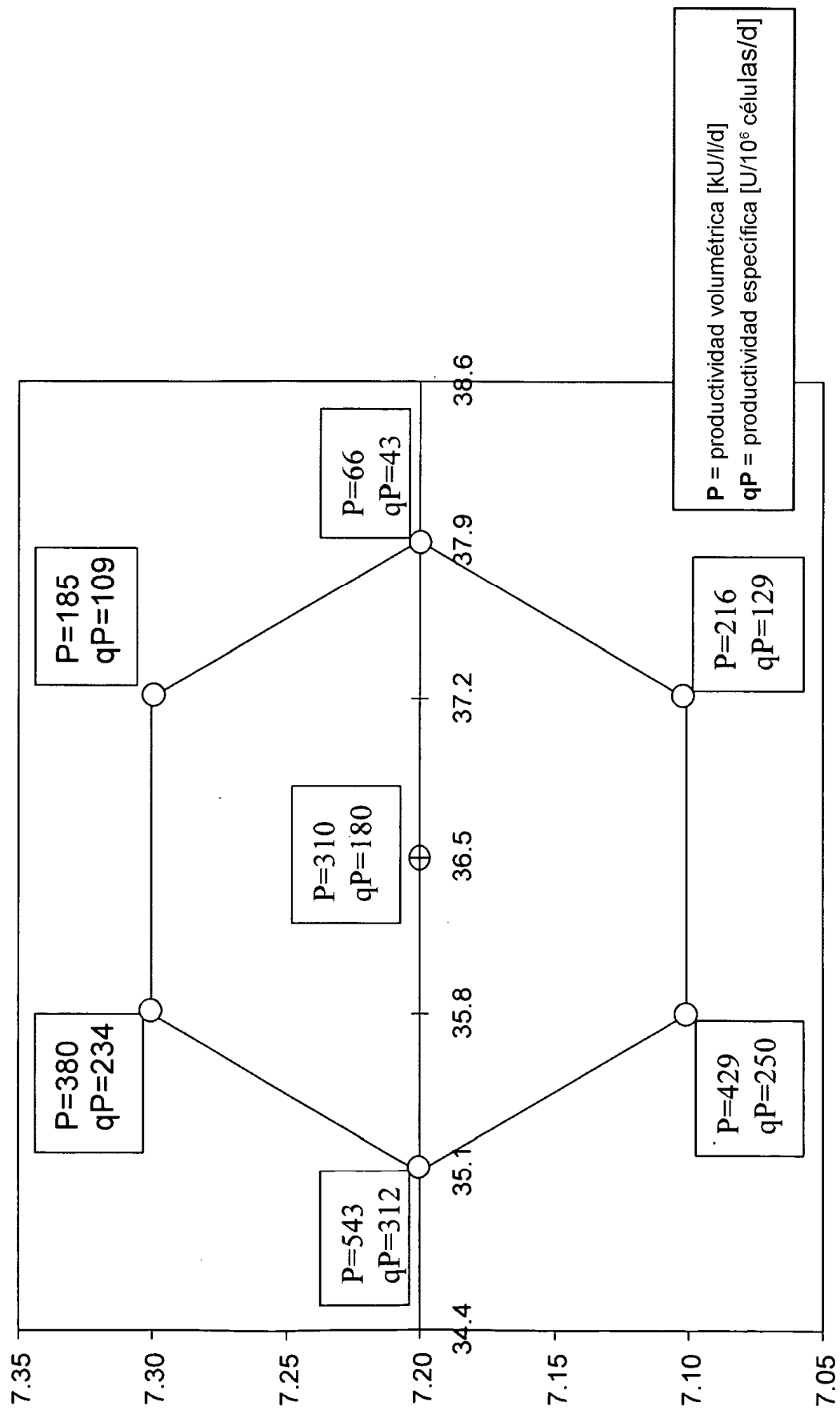
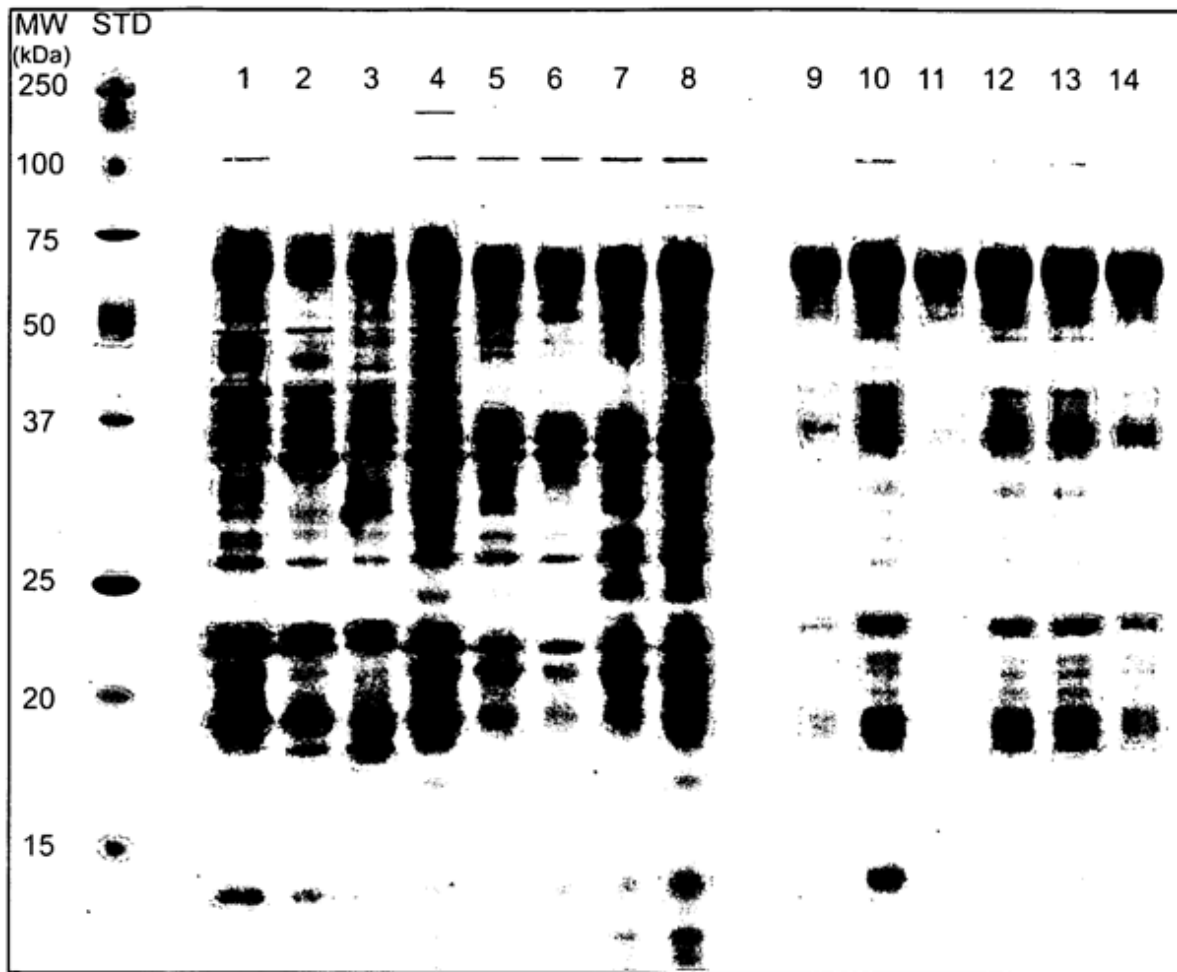


FIG. 11



Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 8%. Los polipéptidos separados se visualizaron mediante tinción de plata.

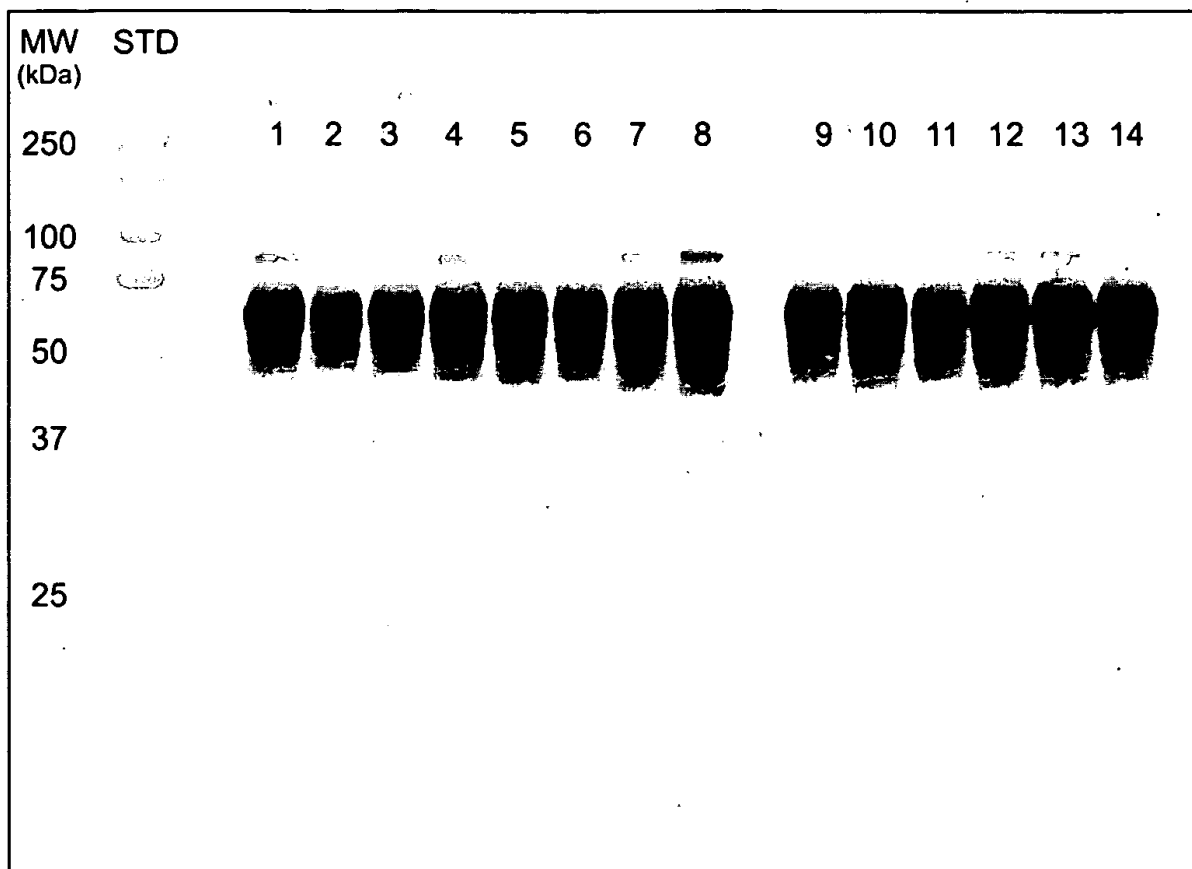
ORFU06002:

Carril 1: MMC 01
Carril 2: MMC 02
Carril 3: MMC 03
Carril 4: MMC 04
Carril 5: MMC 05
Carril 6: MMC 06
Carril 7: MMC 07
Carril 8: MMC 08

ORFU07002:

Carril 9: MMC 01
Carril 10: MMC 02
Carril 11: MMC 03
Carril 12: MMC 04
Carril 13: MMC 05
Carril 14: MMC 06

FIG. 12



Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 8%. Los polipéptidos separados se visualizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-furina de cabra (Alexis Mon-148) como el primer anticuerpo.

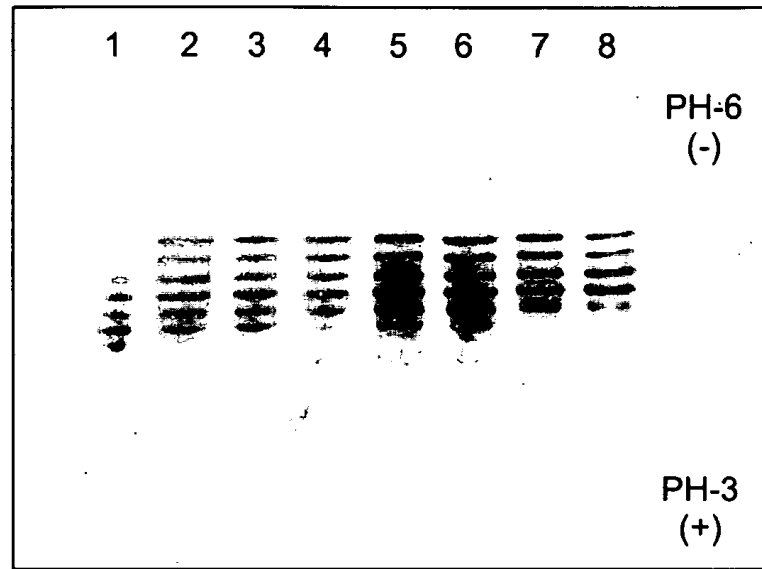
ORFU06002:

Carril 1: MMC 01
 Carril 2: MMC 02
 Carril 3: MMC 03
 Carril 4: MMC 04
 Carril 5: MMC 05
 Carril 6: MMC 06
 Carril 7: MMC 07
 Carril 8: MMC 08

ORFU07002:

Carril 9: MMC 01
 Carril 10: MMC 02
 Carril 11: MMC 03
 Carril 12: MMC 04
 Carril 13: MMC 05
 Carril 14: MMC 06

FIG. 13

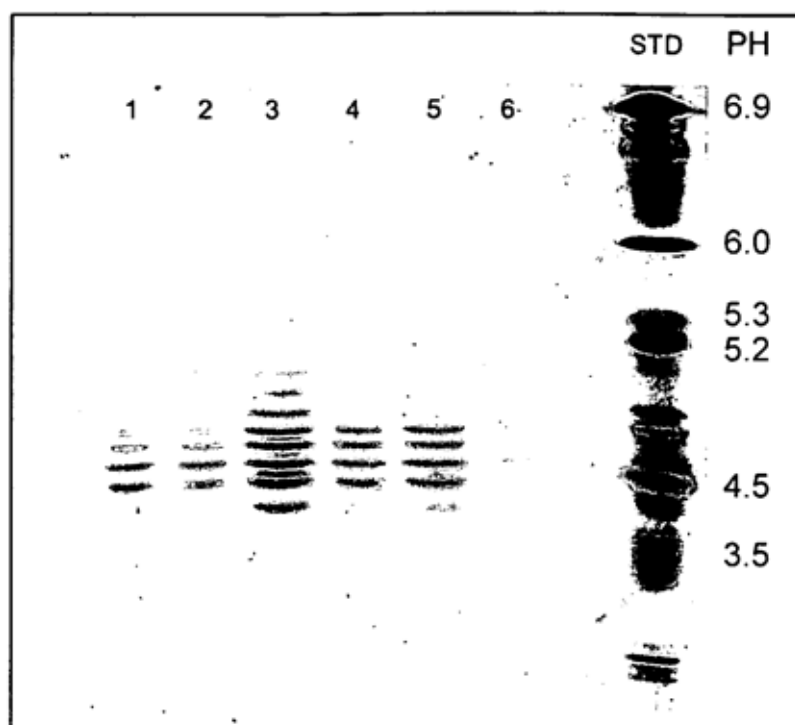


Las muestras se analizaron mediante IEF vertical usando un gradiente de pH de 7,0 - 3,0. Los polipéptidos separados se visualizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-furina de cabra (Alexis Mon-148) como el primer anticuerpo.

ORFU06002:

Carril 1: MMC 01
 Carril 2: MMC 02
 Carril 3: MMC 03
 Carril 4: MMC 04
 Carril 5: MMC 05
 Carril 6: MMC 06
 Carril 7: MMC 07
 Carril 8: MMC 08

FIG. 14



Las muestras se analizaron mediante IEF vertical a pH 7,0 - 3,0. Los polipéptidos separados se visualizaron mediante tinción de Coomassie.

ORFU07002:

Carril 1: MMC 01

Carril 2: MMC 02

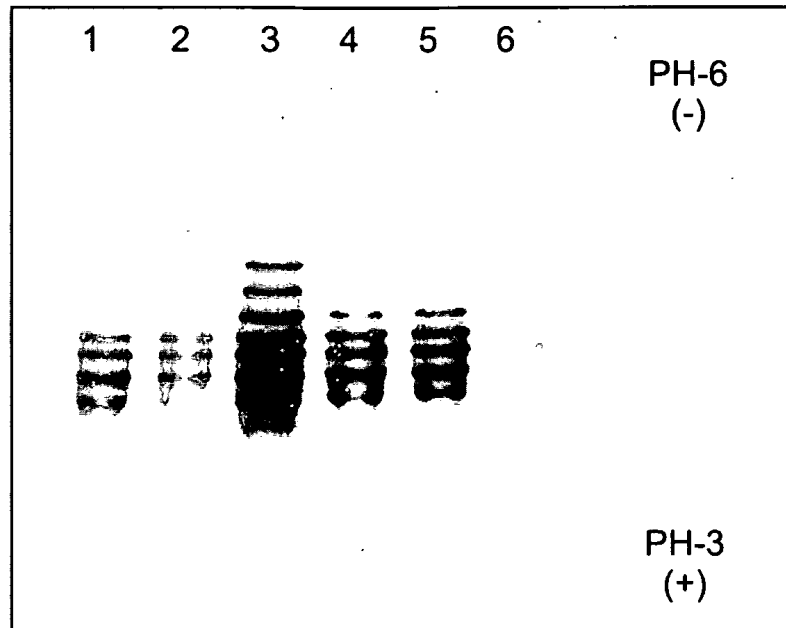
Carril 3: MMC 03

Carril 4: MMC 04

Carril 5: MMC 05

Carril 6: MMC 06

FIG. 15



Las muestras se analizaron mediante IEF vertical a pH 7,0 - 3,0. Los polipéptidos separados se visualizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-furina de cabra (Alexis Mon-148) como el primer anticuerpo.

ORFU07002:

Carril 1: MMC 01
 Carril 2: MMC 02
 Carril 3: MMC 03
 Carril 4: MMC 04
 Carril 5: MMC 05
 Carril 6: MMC 06

FIG. 16

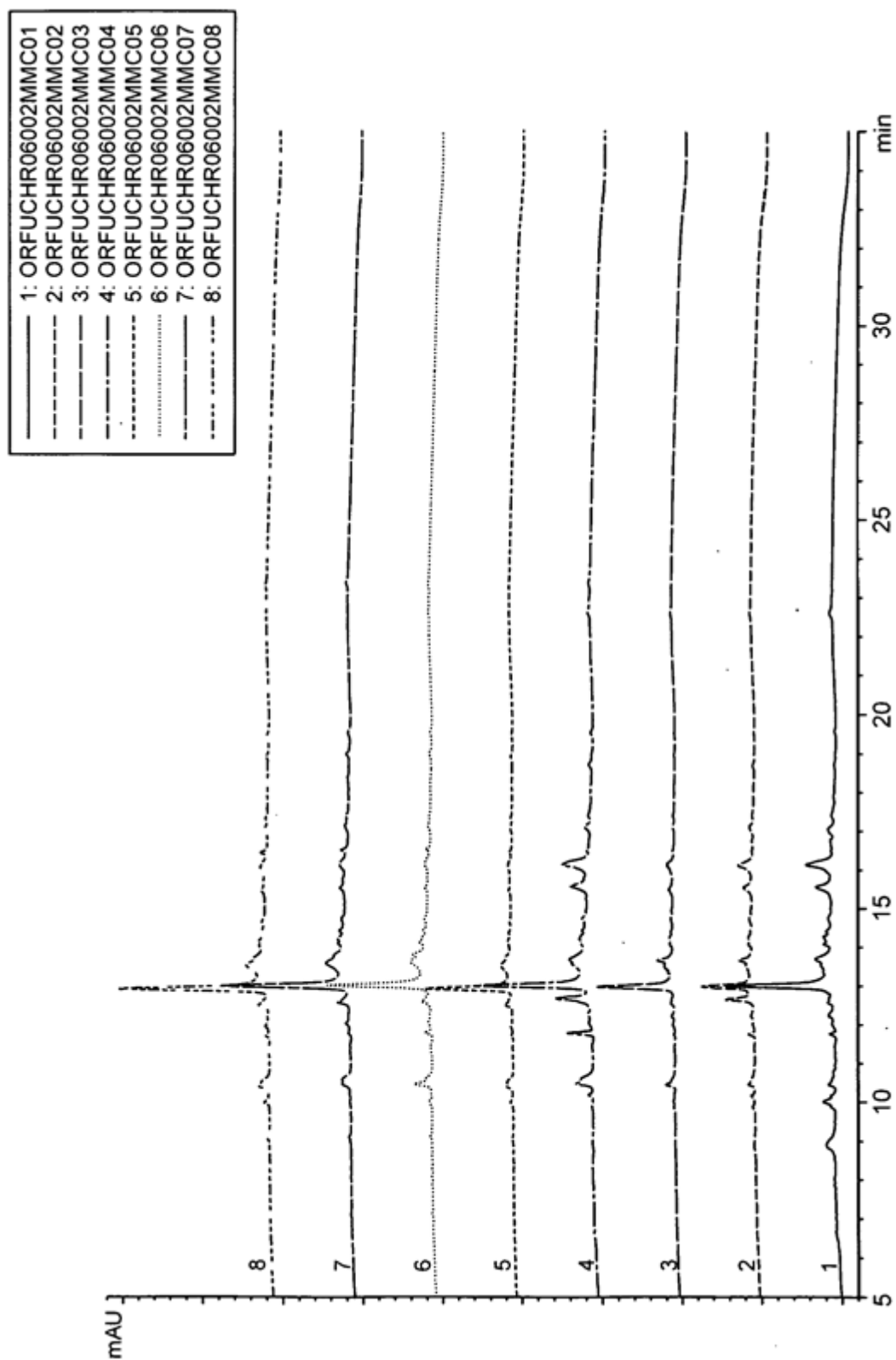
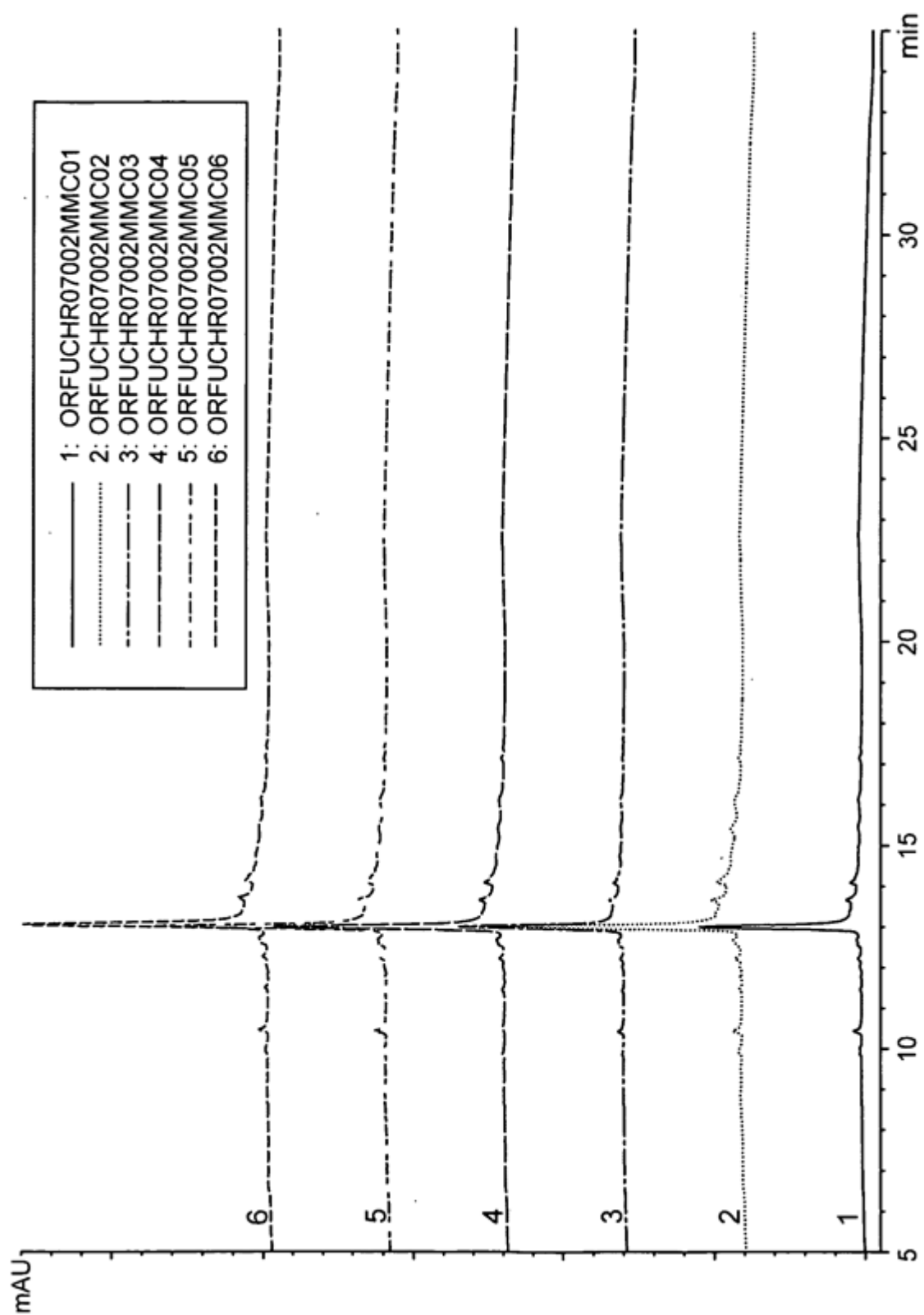


FIG. 17

**FIG. 18**