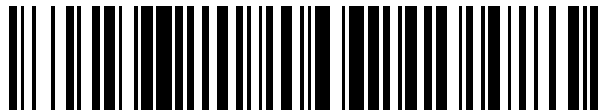


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 923**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)
B01D 61/14 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2011** E 16198419 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** EP 3147355

54 Título: **Método para preparar una disolución acuosa que contiene medio de cultivo y agente quelante**

30 Prioridad:

27.12.2010 JP 2010290444

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

18.03.2021

73 Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**KONNO, YOSHINOBU;
WAKAMATSU, KAIRO;
IMAMOTO, YASUFUMI;
ISHIBASHI, JUN;
TAKAHASHI, KEN y
TANAKA, HISAYA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 812 923 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para preparar una disolución acuosa que contiene medio de cultivo y agente quelante

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un método para preparar una disolución acuosa que incluye un medio de cultivo y un agente quelante, una disolución acuosa preparada mediante el método de preparación, un método para cultivar células utilizando la disolución acuosa que es preparada mediante el método de preparación, un método para producir una sustancia fisiológicamente activa utilizando el método de cultivo, una sustancia fisiológicamente activa producida mediante el método de producción, un método para llevar a cabo la filtración de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación de la disolución acuosa, un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa, o un método para producir la sustancia fisiológicamente activa mediante la preparación de la disolución acuosa, llevando a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa y cultivando después las células utilizando la disolución acuosa.

Antecedentes de la técnica

Las sustancias fisiológicamente activas, en particular las glucoproteínas o anticuerpos, se han aprobado recientemente como diversos tipos de biofarmacéuticos, y actualmente se encuentran en desarrollo más sustancias candidatas (literatura no de patentes nº 1). Por este motivo, se espera que la producción de sustancias fisiológicamente activas, tales como glucoproteínas, anticuerpos o similares utilizando células se llevará a cabo más activamente.

Con respecto a la preparación de una disolución acuosa para el cultivo celular que resulta esencial para la producción de estas sustancias fisiológicamente activas utilizando células, se requiere la esterilización del medio de cultivo para garantizar la seguridad de producto y procedimiento. Hasta el momento, se ha utilizado ampliamente un procedimiento de filtración a través de membrana de 0,2 µm para eliminar los microorganismos en la preparación de la disolución acuosa para el cultivo celular. En los últimos años se ha propuesto un procedimiento de preparación mediante de filtración a través de una membrana de 0,1 µm (literatura no de patentes nº 2). Por lo tanto, se requiere crecientemente una filtrabilidad de membrana excelente de la disolución acuosa para el cultivo celular y constituye un problema.

En comparación con los fármacos de molécula pequeña, los productos biofarmacéuticos requieren elevados costes de producción, lo que también constituye un problema al que se enfrentan las industrias farmacéuticas (literatura no de patente nº 3). Hasta la fecha se han realizado esfuerzos para reducir el coste mediante mejoras de la productividad que resultan de la potenciación de algunos componentes y la adición o enriquecimiento en nuevos componentes de la disolución acuosa para el cultivo celular, aunque, por otra parte, ha crecido la dificultad para conseguir una filtrabilidad de membrana excelente de la disolución acuosa. Debido a las restricciones de las instalaciones y el escalado de los equipos de producción para satisfacer las necesidades del mercado, también existe una necesidad de disoluciones acuosas altamente versátiles para el cultivo celular que puedan filtrarse a través de membrana más establemente en un tiempo corto.

La alteración de los equipos de filtración, la adición de una membrana de filtración o la sustitución del material de la membrana de filtración, o la mejora de las condiciones de disolución, tales como la temperatura, durante la preparación de la disolución acuosa para el cultivo celular, se han intentado con el fin de mejorar la cantidad de filtrado de la membrana o la filtrabilidad a través de la membrana de la disolución acuosa (literatura de patentes nº 1, literaturas no de patente nº 4 y nº 5). Sin embargo, la mejora de la filtrabilidad a través de la membrana de la disolución acuosa para el cultivo celular mediante el incremento de superficie de membrana no resulta industrialmente preferente en términos de restricciones de costes e instalaciones. Además, la mejora de las condiciones de disolución no ha comportado una mejora notable de la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa para el cultivo celular.

Son ampliamente conocidos agentes quelantes tales como ácido cítrico, ácido málico, ácido etilendiaminotetraacético o similares, como uno de los componentes contenidos en la disolución acuosa para el cultivo celular (literaturas de patente nº 2 y 3). El ácido siálico también es conocido como una sustancia que presenta una función quelante (literatura no de patente nº 6). Sin embargo, no existen informes de un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa para el cultivo celular mediante la utilización de agentes quelantes.

60 Literaturas de la técnica anteriorLiteraturas de patente

[Literatura de patente nº 1] publicación de patente japonesa nº Hei-07-506492
 [Literatura de patente nº 2] publicación de patente japonesa nº 2003-250533
 [Literatura de patente nº 3] publicación de patente japonesa nº 2000-217455

Literaturas no de patente

El documento WO 98/08934 se refiere a medios de cultivo de células de mamífero libres de suero y a las utilidades de los mismos.

[Literatura no de patente nº 1] Nature Reviews Drug Discovery, mayo de 2004, vol.3, p.383

[Literatura no de patente nº 2] Nature, junio de 1989, vol.339, p.487-488

[Literatura no de patente nº 3] The Journal of Rheumatology, noviembre de 2006, vol.33, p.2124-2131

[Literatura no de patente nº 4] Pall Corporation, "Filter Sterilization of Samples (1-100 mL) in Sterile Acrodisc (marca comercial registrada) Syringe Filters.5.3", [online], [búsqueda el 15 de noviembre de 2010], internet <<http://www.pall.com/variants/pdf/pdf/laboratory-49533.pdf>>

[Literatura no de patente nº 5] Libro de resumen del The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, septiembre de 2010, p. 127

[Literatura no de patente nº 6] Journal of Dental Research, May 1967, vol.46, nº 3, p.514-521

Divulgación de la invenciónProblemas que debe resolver la invención

De acuerdo con la divulgación, a partir de los problemas anteriormente indicados, la presente exposición proporciona un método de preparación para una disolución acuosa que presenta una filtrabilidad notablemente mejorada, una disolución acuosa preparada mediante el método de preparación, un método para cultivar células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación, un método para producir una sustancia fisiológicamente activa utilizando el método de cultivo, una sustancia fisiológicamente activa producida mediante el método de producción, un método para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación de la disolución acuosa, un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa, o un método para producir la sustancia fisiológicamente activa mediante la preparación de la disolución acuosa llevando a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa, seguido del cultivo de las células utilizando la disolución acuosa.

Efecto de la invención

Inesperadamente, en el contexto de la presente invención se ha descubierto por primera vez que la filtrabilidad de membrana de una disolución acuosa puede mejorarse en gran medida mediante la adición de un agente quelante en un método de preparación de la disolución acuosa. En el contexto de la presente invención se ha descubierto asimismo que el agente quelante mejora la filtrabilidad de membrana de una manera dependiente de la concentración en el método de preparación de la disolución acuosa.

Además, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa puede mejorarse en gran medida mediante la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa en el método de preparación de la disolución acuosa. Además, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que puede producirse una sustancia fisiológicamente activa mediante el cultivo de células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante la adición del agente quelantes antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

Basándose en estos resultados, se ha demostrado que puede proporcionarse un método para preparar una disolución acuosa que incluye un medio de cultivo y un agente quelante. Además, se ha demostrado que puede proporcionarse una disolución acuosa preparada mediante el método de preparación, un método para cultivar células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación, un método para producir una sustancia fisiológicamente activa utilizando el método para cultivar células y una sustancia fisiológicamente activa producida mediante el método para producir la sustancia fisiológicamente activa.

Además, se ha demostrado que puede proporcionarse un método para llevar a cabo una filtración a través de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación de la disolución acuosa y un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa, caracterizado porque la disolución acuosa se prepara utilizando un agente quelante. Se ha demostrado además que puede proporcionarse un método para producir la sustancia fisiológicamente activa mediante la realización de una filtración a través de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación, seguido del cultivo de las células utilizando la disolución acuosa resultante.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1]. La figura 1 muestra que la filtrabilidad de una disolución acuosa se mejora mediante la adición de un agente quelante, en la que el eje vertical representa la cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana [$V_{m\acute{a}x}$ (L/m²)] y el eje horizontal representa el agente quelante utilizado.

[Figura 2]. La figura 2 muestra que la filtrabilidad de la disolución acuosa resulta notablemente mejorada mediante la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa, en la que el eje vertical representa la cantidad de procesamiento máximo por unidad de superficie de membrana [$V_{\text{máx}}$ (L/m^2)] y el eje horizontal representa el punto temporal de adición del agente quelante.

[Figura 3]. La figura 3 muestra que el agente quelante mejora la filtrabilidad de una manera dependiente de la concentración, en la que el eje vertical representa la cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana [$V_{\text{máx}}$ (L/m^2)] y el eje horizontal representa la concentración (g/l) del agente quelante.

[Figura 4]. La figura 4 muestra que el efecto de mejora de la filtrabilidad del agente quelante no depende de los materiales de la membrana y de las estructuras de la membrana, en la que el eje vertical representa la cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana [$V_{\text{máx}}$ (L/m^2)] y el eje horizontal representa el material de la membrana de filtración.

[Figura 5]. La figura 5 muestra que la filtrabilidad de una disolución acuosa resulta notablemente mejorada por la adición de un agente quelante, en la que el eje vertical representa la cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana [$V_{\text{máx}}$ (L/m^2)] y el eje horizontal representa el tipo de disolución.

Formas de realización para poner en práctica la invención

A continuación, se describe en detalle la presente divulgación.

La presente exposición se refiere a un método para preparar una disolución acuosa que incluye un medio de cultivo y un agente quelante, en el que se añade el agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

La disolución acuosa es, aunque sin limitación particular, preferentemente una disolución acuosa que permite el cultivo de células o similar (también denominada disolución acuosa para el cultivo celular).

El medio de cultivo puede ejemplificarse mediante un medio de cultivo en polvo, un medio de cultivo líquido o un medio de cultivo de suspensión. El medio de cultivo puede seleccionarse apropiadamente a partir de medios de cultivos disponibles comercialmente o puede utilizarse una mezcla de dos o más de los mismos. Además, puede seleccionarse el medio de cultivo conocido descrito en las literaturas.

Además, el medio de cultivo puede ejemplificarse mediante un medio de cultivo para cultivar células bacterianas, un medio de cultivo para cultivar células de levadura, un medio de cultivo para cultivar células vegetales, un medio de cultivo para cultivar células animales o similares. Entre ellos, el medio de cultivo para cultivar células animales resulta preferente. Además, el medio de cultivo puede ser, aunque sin limitación particular, por ejemplo, un medio de cultivo de expansión, un medio de cultivo basal (inicial), un medio de cultivo de alimentación o similar.

Además, el medio de cultivo puede ser cualquiera de un medio de cultivo sintético, un medio semisintético o un medio de cultivo natural. Por ejemplo, puede incluir un medio de cultivo basal, un medio de cultivo que contiene suero, un medio de cultivo sin suero, un medio de cultivo que no contiene componentes de origen animal, un medio de cultivo libre de proteínas o similares. Entre ellas, el medio de cultivo libre de suero, el medio de cultivo libre de proteínas o el medio de cultivo totalmente sintético resultan preferentes.

El medio de cultivo para el cultivo celular es un medio de cultivo para cultivar células animales, y más preferentemente un medio de cultivo para cultivar células CHO derivadas de tejido ovárico de hámster chino.

Entre los ejemplos del medio de cultivo basal puede incluirse medio de cultivo disponible comercialmente de cada compañía, tal como medio de cultivo RPMI1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], un medio de cultivo MEM de Eagle [Science, 122, 501(1952)], un medio de cultivo MEM modificado por Dulbecco (DMEM) [Virology, 8, 396(1959)], un medio de cultivo 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], un medio de cultivo F12 (fabricado por LTI) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)], un medio de Dulbecco modificado por Iscove (medio de cultivo IMDM) [J. Experimental Medicine, 147,923 (1978)], un medio de cultivo EX-CELL (marca comercial registrada) 302, un medio de cultivo EX-CELL (marca comercial registrada) 325 (fabricado por SAFB Bioscience) o un medio de cultivo CHO-S-SFMII (fabricado por Invitrogen), o medio de cultivo modificado de los mismos, o mezclas de los mismos, o similares. De entre ellos, el medio de cultivo RPMI1640, el medio de cultivo DMEM, el medio de cultivo F12, los medios de cultivo IMDM y EX-CELL (marca comercial registrada) 302, o el medio de cultivo SFM de hibridomas (fabricado por Invitrogen) resultan preferentes.

- 5 El medio de cultivo que contiene suero puede incluir, por ejemplo, los preparados mediante adición de uno o más sueros o fracciones de suero seleccionados de sueros de mamíferos, tales como vacas, caballos o similares, sueros de aves, tales como pollos o similares, sueros de peces, tales como la seriola o similares, y fracciones de los mismos, al medio de cultivo basal.
- 10 Entre los ejemplos del medio de cultivo libre de suero pueden incluirse los preparados mediante la adición al medio basal de factores nutricionales, sustancias fisiológicamente activas o similares como alternativas al suero.
- 15 En el medio de cultivo que no contiene ingredientes de origen animal, pueden añadirse sustancias en lugar de ingredientes de origen animal. Entre los ejemplos de las sustancias pueden incluirse sustancias fisiológicamente activas preparadas mediante recombinación genética, hidrolizados, lípidos que no contienen materias primas de origen animal y similares.
- 20 Entre los ejemplos del medio de cultivo libre de proteínas puede incluirse un medio ADPF (medio libre de proteínas de origen animal, fabricado por HyClone), un medio de cultivo CD-hibridoma (fabricado por Invitrogen), un medio de cultivo CD-CHO (fabricado por Invitrogen), un medio de cultivo IS-CD-CHO (fabricado por Irvine Scientific), un medio de cultivo CD-CHO EX-CELL (marca comercial registrada) (fabricado por SAFB Bioscience) y similares.
- 25 El método de preparación del medio de cultivo en polvo es, aunque sin limitación particular, preferentemente un método de preparación mediante un procedimiento de mezcla de ingredientes secos utilizando un molino de discos, un molino de bolas, un molino de pásas o similar, o un método de preparación mediante liofilización de la disolución acuosa preparada previamente.
- 30 El medio de cultivo en polvo incluye un medio de cultivo presente en una forma granular.
- 35 El método de preparación del medio de cultivo en polvo presente en forma granular puede incluir, aunque no se encuentra particularmente limitado, por ejemplo, la tecnología avanzada de granulación Advanced granulation Technology (marca comercial registrada) o similar. Además, el método puede incluir un procedimiento de pulverización de una disolución en la que por lo menos un material seleccionado del grupo que consiste en un agente espesante natural, un agente espesante sintético, un azúcar y una grasa se disuelven sobre ingredientes granulados, y el secado de la misma.
- 40 Pueden seleccionarse apropiadamente factores nutricionales deseados y añadirse al medio de cultivo. Además, los factores nutricionales deseados pueden seleccionarse y utilizarse apropiadamente para constituir el medio de cultivo. Entre los ejemplos de factores nutricionales pueden incluirse fuentes de carbono, tales como azúcares o fuentes nitrógeno, tales como aminoácidos. Entre los ejemplos específicos pueden incluirse aminoácidos, metales, vitaminas, azúcares, sales, lípidos, ácidos nucleicos, sustancias fisiológicamente activas, ácidos grasos, ácidos orgánicos, proteínas, hidrolizados o similares. Estos compuestos pueden formar sales, tales como sales hidrocioruro, sales sódicas, sales potásicas, sales amónicas o similares, y/o solvatos, tales como hidratos o similares.
- 45 Entre los ejemplos de aminoácidos pueden incluirse, aunque sin limitarse particularmente a ellos, por ejemplo, L-alanina (Ala), L-arginina (Arg), L-asparagina (Asn), ácido L-aspartico (Asp), L-cisteína (Cys), L-cistina, ácido L-glutámico (Glu), L-glutamina (Gln), glicina (Gly), L-histidina (His), L-isoleucina (Ile), L-leucina (Leu), L-lisina (Lys), L-metionina (Met), L-fenilalanina (Phe), L-prolina (Pro), L-serina (Ser), L-treonina (Thr), L-triptófano (Trp), L-valina (Val) y similares, y se utilizan solos o en combinaciones de dos o más de los mismos. Además, pueden utilizarse sales, tales como sales hidrocioruro de los mismos y sales sódicas de los mismos y/o solvatos, tales como hidratos de los mismos. Pueden añadirse como péptido, y por ejemplo, se proporcionan a título ejemplar, L-alanil-L-glutamina, L-alanil-L-cisteína, o similares.
- 50 Entre los ejemplos de las sustancias fisiológicamente activas pueden incluirse insulina, transferrina, albúmina sérica, una fracción sérica que contiene factores de crecimiento y similares.
- 55 Entre los ejemplos de los lípidos pueden incluirse colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico y similares. Además, pueden utilizarse sales, tales como sales hidrocioruro de los mismos y sales sódicas de los mismos y/o solvatos, tales como hidratos de los mismos.
- 60 El metal puede incluir, aunque sin limitarse particularmente, por ejemplo, hierro, manganeso, cinc, molibdeno, vanadio, cobre, cadmio, rubidio, cobalto, circonio, germanio, níquel, estaño, cromo, silicio o similares, y pueden utilizarse solos o en combinación de dos o más de los mismos. Estos metales pueden formar sales, tales como sales hidrocioruro, sales sulfato, sales sódicas, sales potásicas, sales amónicas o similares, y/o solvatos, tales como hidratos o similares.
- 65 El azúcar puede ser, aunque sin limitarse particularmente a ellos, cualquiera de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. El azúcar puede incluir además derivados de azúcar, tales como desoxiazúcares, ácidos urónicos, aminoazúcares, alcoholes de azúcar o similares. Entre los ejemplos de los mismos puede incluirse glucosa,

manosa, galactosa, fructosa, ribosa, arabinosa, ribulosa, eritrosa, eritrolosa, gliceraldehído, dihidroxiacetona, sedoheptulosa, maltosa, lactosa, sacarosa o similares, y pueden utilizarse solos o en combinación de dos o más de los mismos. También pueden utilizarse sales de los mismos, tales como sales hidrocioruro, sales sódicas o similares, y/o solvatos de los mismos, tales como hidratos o similares.

5 Entre los ejemplos de las vitaminas pueden incluirse, aunque sin limitarse particularmente a ellos, por ejemplo, d-biotina, ácido D-pantoténico, colina, folato, mioinositol, niacinamida, piridoxal, riboflavina, tiamina, cianocobalamina, DL- α -tocoferol y similares, y pueden utilizarse solos o en combinaciones de dos o más de los mismos. Además, pueden utilizarse sales, tales como sales hidrocioruro de los mismos y sales sódicas de los mismos y/o solvatos, tales como hidratos de los mismos.

10 El hidrolizado puede ejemplificarse mediante hidrolizados de soja, trigo, arroz, guisantes, semilla de algodón, pescado o extracto de levadura, o extractos de los mismos. Un ejemplo específico del mismo puede incluir SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, nº de catálogo 91052-1K3986 o 91052-5K3986).

15 El agente quelante no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que cumpla el uso pretendido de la disolución acuosa preparada mediante la adición del agente quelante. Además, el agente quelante que debe utilizarse de acuerdo con la presente invención puede utilizarse solo o puede utilizarse una pluralidad de tipos de agente quelante.

20 Como agente quelante, resulta particularmente preferente un agente quelante soluble en agua, y entre los ejemplos del mismo se incluyen agentes quelantes basados en ácido aminocarboxílico, basados en ácido oxicarboxílico, basados en ácido carboxílico dibásico inferior, polioles o compuestos inorgánicos. Además, el agente quelante que debe utilizarse de acuerdo con la presente invención puede formar sales o similares con la condición de que mantenga el efecto quelante, y por ejemplo, puede formar sales, tales como sales hidrocioruro, sales sódicas, sales potásicas, sales amónicas o similares, y/o solvatos, tales como hidratos o similares.

25 Entre los ejemplos específicos del agente quelante a base de ácido aminocarboxílico puede incluirse ácido nitrilotriacético (NTA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (NIMDA), ácido etilendiaminodiacético (EDDA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal sódica hierro (III) de ácido etilendiaminotetraacético (sal sódica de EDTA-hierro (III)), ácido N-hidroxietilendiaminotetraacético (HEDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido 1,2-ciclohexanodiamin-tetraacético (CyDTA), ácido trimetilendiaminotetraacético (TMTA), éter dietílico de etilenglicol-ácido diamino-tetraacético (GEDTA), ácido etilendiamino-tetrapropiónico (EDTP), ácido glutámico-ácido N,N-diacético, ácido aspártico-ácido N,N-diacético, glicina, alanina, sales de los mismos y/o solvatos de los mismos, tales como hidratos o similares.

30 Entre los ejemplos específicos del agente quelante a base de ácido oxicarboxílico pueden incluirse ácido láctico, ácido glicólico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido mandélico, sales de los mismos, y/o solvatos de los mismos, tales como hidratos o similares. Entre los ejemplos del agente quelante a base de ácido carboxílico dibásico inferior pueden incluirse ácido oxálico, ácido malónico, sales de los mismos, y/o solvatos de los mismos, tales como hidratos o similares.

35 Entre los ejemplos del poliol pueden incluirse glicoles, tales como etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol o similares, o alcoholes de azúcar. Entre los ejemplos específicos de los mismos pueden incluirse otros inositoles, tales como glicerina, eritrina, arabita, xilita, sorbita, mannita, galactita o similares.

40 Entre los ejemplos del agente quelante a base de compuesto inorgánico pueden incluirse ácido pirofosfórico, ácido trifosfórico, ácido fosfórico condensado, sales de los mismos, y/o solvatos de los mismos, tales como hidratos o similares. En particular, el agente quelante preferente es dihidrato de citrato trisódico, ácido L-málico o sal sódica de ácido etilendiamino-tetraacético y hierro (III).

45 Además, puede utilizarse ácido siálico como el agente quelante. Ácido siálico significa ácido 2-ceto-3-desoxinónico con un esqueleto carboxilato de 9 carbonos y también se conoce como ácido neuramínico.

50 El ácido siálico incluye ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicilneuramínico, ácido O-acetilneuramínico, o ácido deaminoneuramínico, o sales, hidratos y/o derivados de los mismos.

55 Ácido siálico incluye los ácidos que presentan el ácido 5-N-acetil o 5-N-glucilneuramínico como esqueleto y varios grupos hidroxilo O-acetilados. En particular, el ácido siálico preferente que debe utilizarse de acuerdo con la presente invención es dihidrato de ácido N-acetilneuramínico.

60 El agente quelante puede prepararse mediante un método sintético químico conocido públicamente.

65 El agente quelante se añade durante la preparación de la disolución acuosa, antes del ajuste del pH final. En el método de preparación de la disolución acuosa de la presente invención, el orden de adición del agente quelante a la disolución acuosa (tiempos de adición) puede determinarse apropiadamente dependiendo de la composición

del medio de cultivo que debe añadirse, el tipo de agente quelante o similar, en caso de añadirse antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa. La filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa preparada puede mejorarse mediante la adición del agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

5 En el método de preparación de la disolución acuosa de la presente exposición, el agente quelante puede añadirse a la disolución acuosa junto con cualquier medio de cultivo simultáneamente, o antes o después de la adición del medio de cultivo. Preferentemente, el agente quelante puede añadirse a la disolución acuosa antes de la adición del medio de cultivo, o junto con el medio de cultivo, simultáneamente. El agente quelante también puede añadirse al medio de cultivo anticipadamente. La filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa preparada puede mejorarse adicionalmente mediante la adición del agente quelante a la disolución acuosa antes de la adición del medio de cultivo, o junto con el medio de cultivo, simultáneamente.

15 En la presente invención, el ajuste del pH final se refiere a un procedimiento de ajuste del pH de la disolución acuosa en un pH predeterminado. El pH final se ajusta dependiendo del uso pretendido de la disolución acuosa. En el caso de que la disolución acuosa sea la disolución acuosa para el cultivo celular, el valor del pH puede ser cualquier valor, con la condición de que las células puedan cultivarse en el valor del pH. En el caso de que no se requiera el ajuste del pH, la adición final de las sustancias a la disolución acuosa que debe estar contenida en la disolución acuosa se considera el ajuste del pH final.

20 El ajuste del pH final puede llevarse a cabo utilizando cualquier ácido o álcali. Entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluirse bicarbonato sódico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico o similares.

25 Un ejemplo de consideración de la adición final de la sustancia a la disolución acuosa que debe encontrarse contenida en la disolución acuosa como ajuste del pH final es un agente tamponador, tal como Na₂CO₃, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES), o ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico (MOPS) ya contenido en el medio de cultivo para ajustar el pH.

30 La cantidad de adición del agente quelante descrito en la presente memoria no se encuentra particularmente limitada, aunque resulta preferente que tal cantidad se añada de manera que la concentración del agente quelante añadido a la disolución acuosa después de la preparación de la disolución acuosa sea preferentemente de 0,001 mmoles/l o superior, más preferentemente de 0,01 mmoles/l o superior, mucho más preferentemente de 0,1 mmoles/l o superior, y particularmente preferentemente de 0,34 mmoles/l o superior.

35 Además, la cantidad añadida del agente quelante descrito en la presente memoria a la disolución acuosa puede ser apropiadamente seleccionada por el experto en la materia dentro del intervalo de 0,001 a 1.000 mmoles/l, de 0,01 a 100 mmoles/l, de 0,1 a 100 mmoles/l, y de 0,1 a 50 mmoles/l, y también puede añadirse una cantidad para que el agente quelante preferentemente se encuentre a una concentración de 0,34 a 89 mmoles/l, más preferentemente de 0,34 a 15 mmoles/l, y particularmente preferente de 0,34 a 6,8 mmoles/l. La concentración del agente quelante en la disolución acuosa preparada puede incrementarse adicionalmente con un complejo de quelato de metal (tal como hierro) que se añade al medio como fuente metálica de hierro o similar.

45 En la preparación de la disolución acuosa de la presente invención, pueden añadirse hidrolizados, sales metálicas, azúcares, vitaminas, aminoácidos, agentes de ajuste del pH, ácidos orgánicos, ácidos grasos, péptidos, sustancias fisiológicamente activas, lípidos, ácidos nucleicos o similares, o pueden añadirse en parte después de la mezcla con el medio de cultivo. Puede añadirse una mezcla de sales metálicas, azúcares o vitaminas con el medio de cultivo.

50 Las células descritas en la presente memoria pueden ser cualesquiera de células eucarióticas y células procarióticas, y entre los ejemplos de las mismas pueden incluirse células derivadas de mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos, plantas o similares; microorganismos, tales como bacterias, *E. coli*, *Bacillus subtilis* o similares; células derivadas de microorganismos, tales como bacterias, *E. coli*, *Bacillus subtilis* o similares, o levaduras o células derivadas de levaduras, o similares.

55 Entre ellas, las células de animales pertenecientes a los mamíferos resultan preferentes; las células animales derivadas de primates, tales como seres humanos o monos, o las células animales derivadas de roedores, tales como ratones, ratas o hámsters, resultan más preferentes, o las células CHO derivadas de tejido ovárico de hámster chino son las más preferentes.

60 Las células CHO derivadas de tejido ovárico de hámster chino para la utilización de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier estirpe celular establecida a partir de tejido ovárico de hámster chino (*Cricetulus griseus*).

65 Específicamente, por ejemplo, células CHO descritas en documentos tales como Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968), Genetics, 55, 513 (1968), Chromosoma, 41, 129 (1973), Methods in Cell Science, 18, 115 (1996), Radiation Research, 148, 260 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

77,4216 (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968), Cell, 6, 121 (1975), Molecular Cell Genetics, apéndices I y II, 883-900.

5 Además, los ejemplos de los mismos pueden incluir la línea CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), la línea DUXB11 (ATCC nº CRL-9096), la línea Pro-5 (ATCC nº CRL-1781), CHO/dhfr (ATCC nº CRL-9096) registrada en la ATCC (The American Type Culture Collection), la estirpe celular CHO-S disponible comercialmente (Life Technologies Inc., nº de cat. 11619) o CHO/DG44 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)], o subcepas obtenidas mediante la adaptación de estas cepas a diversos medios.

10 Entre los ejemplos de células pertenecientes a mamíferos pueden incluirse células de mieloma, células ováricas, células renales, células sanguíneas, células uterinas, células de tejido conectivo, células de mamífero, células de retinoblastoma embrionario o células derivadas de las mismas. De entre ellas, células seleccionadas de células de mieloma, células derivadas de células de mieloma, células ováricas y células derivadas de células ováricas.

15 Entre los ejemplos de las mismas pueden incluirse estirpes celulares humanas, tales como HL-60 (ATCC nº CCL-240), HT-1080 (ATCC nº CCL-121), HeLa (ATCC nº CCL-2), 293 (ECACC nº 85120602), Namalwa (ATCC nº CRL-1432), Namalwa KJM-1 [Cytotechnology, 1, 151(1988)], NM-F9 (DSM ACC2605, publicación internacional nº WO 2005/017130) y PER.C6 (ECACC nº 96022940, patente nº US 6855544); estirpes celulares de mono, tales como VERO (ATCC nº CCL-1651) y COS-7 (ATCC nº CRL-1651); estirpes celulares de ratón, tales como C1271 (ATCC nº CRL-1616), Sp2/0-Ag14 (ATCC nº CRL-1581) y NIH3T3 (ATCC nº CRL-1658), NS0 (ATCC nº CRL-1827); estirpes celulares de rata, tales como Y3 Ag 1.2.3 (ATCC nº CRL-1631), YO (ECACC nº 85110501) y YB2/0 (ATCC nº CRL-1662); estirpes celulares de hámster, tales como células CHO derivadas de tejido ovárico de hámster chino descritas anteriormente y BH-K21 (ATCC nº CRL-10); células de perro, tales como MDCK (ATCC nº CCL-34) y similares.

25 Entre los ejemplos de células pertenecientes a aves pueden incluirse la estirpe celular de pollo SL-29 (ATCC nº CRL-29) y similares. Entre los ejemplos de células pertenecientes a peces pueden incluirse la estirpe celular de pez cebra ZF4 (ATCC nº CRL-2050) y similares.

30 Entre los ejemplos de células pertenecientes a insectos puede incluirse la estirpe celular de polilla (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 (ATCC nº CRL-1711) y similares. Entre los ejemplos de células de cultivo primario utilizadas en la producción de vacunas pueden incluirse células renales de mono primarias, células renales de conejo primarias, células embrionarias de pollo primarias, células embrionarias de codorniz primarias y similares.

35 Entre los ejemplos de célula de mieloma o de células derivadas de células de mieloma pueden incluirse Sp2/0-Ag14, NS0, Y3 Ag 1.2.3., YO o YB2/0 y similares. Entre los ejemplos de células ováricas o células derivadas de células ováricas pueden incluirse las células CHO derivadas de tejido ovárico de hámster chino indicadas anteriormente y similares. Además, entre los ejemplos de células renales pueden incluirse 293, VERO, COS-7, BHK21, MDCK y similares.

40 Entre los ejemplos de células sanguíneas pueden incluirse HL-60, Namalwa, Namalwa KJM-1, NM-F9 y similares. Entre los ejemplos de células uterinas pueden incluirse HeLa y similares. Entre los ejemplos de células del tejido conectivo pueden incluirse HT-1080, NIH3T3 y similares. Entre los ejemplos de células de mamífero pueden incluirse C1271 y similares. Entre los ejemplos de células de retinoblastoma embrionario puede incluirse PER.C6 y similares, respectivamente.

45 Las células pueden ser, aunque la presencia o ausencia de su capacidad de producir la sustancia no se encuentra particularmente limitada, por ejemplo, células iPS obtenidas mediante la introducción de varios genes en células somáticas, células espermáticas u óvulos recogidos de un mamífero donante, incluyendo seres humanos, células productoras de sustancias y células de fusión productoras de sustancias, o similares.

50 Entre ellas, las células productoras de sustancias o las células de fusión productoras de sustancias resultan preferentes. Las células animales productoras de sustancias, las células de fusión derivadas de animales productoras de sustancias, o similares, resultan más preferentes. Por ejemplo, en el caso de que la sustancia deseada sea un anticuerpo, puede proporcionarse a modo de ejemplo un hibridoma, que es una célula de fusión de células de mieloma y células productoras de anticuerpos, tales como células B o similares. Además, las células animales productoras de sustancias mediante un tratamiento de mutación, las células animales tratadas con mutaciones para incrementar el nivel de expresión de las sustancias o similares, se encuentran incluidas en la expresión células animales.

60 Entre los ejemplos de células animales que se mutan para producir la sustancia pueden incluirse células en las que se introducen mutaciones en enzimas de modificación de las proteínas con el fin de producir la sustancia deseada o similar. Por ejemplo, en el caso de que la sustancia deseada sea una glucoproteína, se proporcionan como ejemplo células en las que se introducen mutaciones en una diversidad de enzimas de modificación de cadenas sacáridas con el fin de cambiar la estructura de las cadenas sacáridas, o similares.

65

Además, las células animales productoras de la sustancia pueden ser cualesquiera células animales, con la condición de que sean capaces de producir la sustancia deseada. Por ejemplo, están incluidas las células animales que se transforman con un vector recombinante que contiene un gen que participa en la producción de sustancias. Las células transformantes pueden obtenerse mediante la introducción de un vector recombinante que contiene ADN y un promotor que participan en la producción de la sustancia en células pertenecientes a los mamíferos anteriormente indicados.

Para el ADN implicado en la producción de la sustancia, por ejemplo, puede utilizarse cualquiera ADN codificante de una sustancia, tal como péptidos o similares, y ADN codificante de un enzima o una proteína que participa en la biosíntesis de la sustancia y similar.

Para el promotor, puede utilizarse cualquiera de los promotores que funcionan en las células animales utilizadas en la presente invención, y entre los ejemplos de las mismas puede incluirse un promotor del gen temprano inmediato (IE) del citomegalovirus (CMV), un promotor temprano de SV40, un promotor retroviral, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, un promotor SR α y similares. También puede utilizarse un intensificador del gen IE del CMV humano o similar, junto con el promotor.

El vector recombinante puede prepararse utilizando el vector deseado. Para el vector utilizado para la preparación del vector recombinante, puede utilizarse cualquiera de los vectores que funcionan en las células animales utilizadas en la presente invención. Entre los ejemplos de los mismos pueden incluirse pcDNA1, pcDM8 (fabricado por Funakoshi), pAGE107 [publicación de patente n^o JP H3-22979, Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (publicación de patente n^o JP H2-227075), pcDM8 [Nature, 329, 840 (1987)], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pAGE210 y similares.

Para el método de introducción de vector recombinante en las células hospedadoras, puede utilizarse cualquier método, con la condición de que sea capaz de introducir ADN en las células hospedadoras, y entre los ejemplos de las mismas pueden incluirse la electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], un método de fosfato de calcio [publicación de patente n^o JP H2-227075], la lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987), Virology, 52, 456 (1973)] y similares.

Entre los ejemplos específicos de células transformadas pueden incluirse la célula transformada productora de anticuerpos quiméricos humanos anti-GD3 7-9-51 (FERM n^o BP-6691), las células transformadas productoras de anticuerpos quiméricos anti-CCR4 KM2760 (FERM n^o BP-7054), las células transformadas productoras de anticuerpo humanizado anti-CCR4 KM8759 (FERM n^o BP-8129) y KM8760 (FERM n^o BP-8130) y 709 LCA-500D (FERM n^o BP-8239), y las células transformadas productoras del anticuerpo quimérico anti-cadena α de receptor de IL-5 KM7399 (FERM N^o BP-5649), las células transformadas productoras de anticuerpos anti-cadena α de receptor de IL-5 injertado con CDR KM8399 (FERM n^o BP-5648) y KM9399 (FERM n^o BP-5647), las células transformadas productoras de anticuerpo anti-GM2 injertado con CDR humano KM8966 (FERM n^o BP-5105), KM8967 (FERM n^o BP-5106), KM8969 (FERM n^o BP-5527), KM8970 (FERM n^o BP-5528), la línea de células transformadas productoras de anticuerpo anti-CD20 Ms704-CD20 (FERM n^o BP-10092), las células transformadas productoras de antitrombina III Ms705-pKAN-ATIII (FERM n^o BP-8472) y similares.

La presente exposición se refiere a una disolución acuosa que se prepara mediante el método para preparar la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, caracterizado porque se añade el agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

Además, la presente exposición se refiere a un método de cultivo de células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación de la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, caracterizado porque el agente quelante se añade antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

Entre los ejemplos del método de cultivo celular puede incluirse el cultivo por lotes, el cultivo por lotes repetidos, el cultivo alimentado por lotes, el cultivo de perfusión o similares. El método de cultivo de células puede ser cualquier método, con la condición de que resulta adecuado para las células utilizadas y resulta preferente el cultivo alimentado por lotes.

Específicamente, el cultivo típicamente se lleva a cabo, por ejemplo, bajo las condiciones de pH 6 a 8, de 30°C a 40°C, por ejemplo, durante 3 a 20 días en cultivo alimentado por lotes o durante 3 a 60 días en cultivo de perfusión. Durante el cultivo, en caso necesario, también pueden añadirse al medio de cultivo antibióticos tales como la estreptomycinina o la penicilina. Además, para el control de la concentración de oxígeno disuelto, el control del pH, el control de la temperatura, la agitación, o similares, puede utilizarse el método típicamente utilizado en el cultivo celular.

El método de almacenamiento de la disolución acuosa no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que sea un método de mantenimiento de la disolución acuosa bajo condiciones asépticas, por ejemplo un método que utiliza un tanque de acero inoxidable, una bolsa desechable, o similares.

El método de cultivo puede llevarse a cabo en cualquier volumen de cultivo, por ejemplo en un volumen de cultivo diminuto, de 0,1 a 10 ml, típicamente utilizando una placa de cultivo celular, en un volumen de cultivo pequeño, de 10 a 1.000 ml, típicamente utilizando un matraz Erlenmeyer, o en incluso un volumen de cultivo grande, de 1 a 20.000 l, para la producción comercial, típicamente utilizando un recipiente de cultivo o similar, tal como frascos.

Además, la presente exposición se refiere a un método para producir una sustancia fisiológicamente activa, que comprende cultivar las células utilizando la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, que se prepara mediante la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.

En el caso de que la sustancia fisiológicamente activa que se produce mediante el método para producir la sustancia fisiológicamente activa de la presente invención sea un péptido o una proteína, puede utilizarse un método de expresión directa de producción del péptido o la proteína en una célula hospedadora, el método de producción y secreción del péptido o la proteína fuera de las células hospedadoras o similares (Molecular Cloning, segunda edición).

El péptido o proteína puede secretarse activamente hacia el exterior de las células hospedadoras mediante la utilización del método de Paulson et al. [J.Biol.Chem., 264, 17619(1989)], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227(1989), Genes Develop., 4, 1288(1990)], o el método descrito en la publicación de patente japonesa nº Hei-05-336963, o la publicación de patente internacional nº 94/23021. En otras palabras, el péptido o proteína deseado puede secretarse activamente hacia el exterior de las células hospedadoras mediante su expresión en forma de combinación del péptido de señal en el extremo N-terminal del péptido o proteína deseado utilizando un método de recombinación genética.

Además, la cantidad producida del péptido o proteína deseado puede incrementarse mediante la utilización de un sistema de amplificación génica utilizando un gen de dihidrofolato reductasa descrito en la publicación de patente japonesa nº Hei-02-227075 o similar.

El péptido o proteína deseado producido mediante el método de la presente invención puede aislarse y purificarse, por ejemplo, utilizando un método típico de aislamiento y purificación de un péptido o proteína.

Tras completar el cultivo, en el caso de que el péptido o proteína deseado se expresa en un estado disuelto dentro de las células, éstas se recolectan mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuosa y se rompen utilizando un sonicador, una prensa francesa, un homogeneizador de Manton-Gaulin o un molino Dymomill, de manera que se obtiene un extracto libre de células.

Resulta posible obtener un producto purificado en bruto o un producto purificado a partir del sobrenadante que puede obtenerse mediante centrifugación del extracto libre de células utilizando un método típico de aislamiento y purificación de péptidos o proteínas, es decir, una extracción con solvente, la precipitación con elevada concentración salina con sulfato amónico, o similares, la desalación, la precipitación con solventes orgánicos, la cromatografía de intercambio aniónico utilizando resinas, tales como dietilaminoetil-sefarosa o DIAION HPA-75 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corp.), la cromatografía de intercambio catiónico utilizando resinas tales como S-sepharose FF (fabricada por Pharmacia), la cromatografía hidrofóbica utilizando resinas tales como butil-sefarosa o fenil-sefarosa, la filtración en gel utilizando un tamiz molecular, la cromatografía de afinidad utilizando resinas que contiene proteína A, proteína G o similar, el cromatofoco y la electroforesis, tal como el enfoque isoeléctrico, solos o en combinación.

En el caso de que el péptido o proteína deseado se secrete hacia el exterior de la célula, el péptido o proteína puede recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo. Es decir, se obtiene el sobrenadante de cultivo mediante tratamiento del cultivo mediante un método tal como la centrifugación tal como se ha indicado anteriormente, y puede obtenerse un producto purificado en bruto o un producto purificado a partir del sobrenadante de cultivo mediante el método de aislamiento y purificación descrito anteriormente.

La sustancia fisiológicamente activa puede ser cualquier sustancia con la condición de que pueda ser producida por células, preferentemente células animales. Resulta preferente una sustancia producida por células de un animal perteneciente a los mamíferos. Entre los ejemplos de la sustancia pueden incluirse aminoácidos, péptidos, proteínas o moléculas de catalizador biológico, tales como ribozimas, moléculas de formación/retención estructural, tales como queratina, colágeno, elastina, resilina o fibroína; vacunas, tales como la vacuna de la viruela, la vacuna de la polio, la vacuna del sarampión, la vacuna de la rubeola, la vacuna de la parotiditis, la vacuna de la rabia, la vacuna de la varicela, la vacuna de la fiebre efímera bovina, la vacuna de la enfermedad de Ibaraki o la vacuna de la traqueítis bovina infecciosa, o virus, tales como adenovirus o baculovirus, o similares.

El péptido preferentemente es un péptido derivado de células eucarióticas, más preferentemente un péptido derivado de células animales, y entre los ejemplos del mismo puede incluirse un péptido derivado de células de mamífero. Además, el péptido puede encontrarse en cualquier forma, con la condición de que incluya el péptido deseado y presente la actividad, y el péptido puede ser, por ejemplo, un péptido modificado artificialmente, tal como un péptido de fusión preparado mediante fusión con otros péptidos y similares, o un péptido compuesto de

fragmentos parciales de péptido.

Entre los ejemplos del péptido puede incluirse un péptido de los fragmentos parciales de glucoproteína que mantenga la actividad de la glucoproteína. En el caso de que la glucoproteína sea un enzima, también se encuentran incluidos un péptido que modula la actividad enzimática y un péptido que mantenga la estructura del enzima o similar. Entre los ejemplos específicos del péptido que modula la actividad enzimática puede incluirse un péptido que actúa como un agonista o antagonista de glucoproteína o similar.

Puede utilizarse cualquier agonista como el agonista con la condición de que sea un péptido con una actividad de potenciación de la actividad de glucoproteína, y un ejemplo específico de la misma puede incluir derivados de somatostatina, somatotropina, péptido natriurético atrial, glucagón, insulina, factor de crecimiento similar a insulina, gonadotropina y similares.

Como antagonista puede utilizarse cualquier antagonista, con la condición de que sea un péptido con una actividad de inhibición de la actividad de glucoproteína, y un ejemplo específico de la misma puede incluir pegvisomant y similares.

La proteína puede ser preferentemente una proteína derivada de una célula eucariótica, y más preferentemente, una proteína derivada de una célula animal, por ejemplo una proteína derivada de una célula de mamífero. Además, la proteína puede presentar cualquier estructura con la condición de que incluya la proteína deseada y presente la actividad de la misma. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína modificada artificialmente, tal como una proteína de fusión fusionada con otra proteína, o una proteína que consiste en un fragmento parcial.

Entre los ejemplos específicos de la proteína pueden incluirse glucoproteínas, anticuerpos o similares.

Entre los ejemplos específicos de la glucoproteína puede incluirse eritropoyetina (EPO) [J. Biol. Chem., 252, 5558 (1977)], trombopoyetina (TPO) [Nature, 369 533 (1994)], un activador del plasminógeno de tipo tisular, prourocinasa, trombomodulina, antitrombina III, proteína C, proteína S, factor VII de coagulación sanguínea, factor VIII de coagulación sanguínea, factor IX de coagulación sanguínea, factor X de coagulación sanguínea, factor XI de coagulación sanguínea, factor XII de coagulación sanguínea, un complejo de protrombina, fibrinógeno, albúmina, hormona gonadotrópica, hormona estimulante del tiroides, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos, activina, factor osteogénico, factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [J. Biol. Chem., 258, 9017 (1983)], factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) [J. Exp. Med., 173, 269 (1992)], factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) [J. Biol. Chem., 252, 1998 (1977)], interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-2 (IL-2) [Science, 193, 1007 (1976)], interleucina 6, interleucina 10, interleucina 11, interleucina-12 (IL-12) [J. Leuc. Biol., 55, 280 (1994)], receptor soluble de interleucina-4, factor α de necrosis tumoral, ADNasa, galactosidasa, glucosidasa α , glucocerebrosidasa, hemoglobina o transferrina, derivados de los mismos, fragmentos parciales de glucoproteína de los mismos y similares.

Puede utilizarse cualquier anticuerpo, con la condición de que presenta una actividad de unión a antígeno, y entre los ejemplos del mismo pueden incluirse anticuerpos que reconocen antígenos asociados a tumor o fragmentos de anticuerpo de los mismos, anticuerpos que reconocen antígenos asociados a alergia o inflamación o fragmentos de anticuerpo de los mismos, anticuerpos que reconocen antígenos asociados a enfermedad cardiovascular o fragmentos de anticuerpo de los mismos, anticuerpos que reconocen antígenos asociados a enfermedad autoinmunitaria o fragmentos de anticuerpo de los mismos, anticuerpos que reconocen antígenos asociados a infección vírica o bacteriana o fragmentos de anticuerpo de los mismos, y similares.

Entre los ejemplos de antígenos asociados a tumor pueden incluirse CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD30, CD32, CD33, CD38, CD40, ligando de CD40 (CD40L), CD44, CD45, CD46, CD47, CD52, CD54, CD55, CD56, CD59, CD63, CD64, CD66b, CD69, CD70, CD74, CD80, CD89, CD95, CD98, CD105, CD134, CD137, CD138, CD147, CD158, CD160, CD162, CD164, CD200, CD227, adrenomedulina, proteína-4 relacionada con angiopoyetina (ARP4), aurora, B7-H1, B7-DC, integrina, antígeno-2 estromal de médula ósea (BST2), CA125, CA19.9, anhidrasa carbónica 9 (CA9), cadherina, receptor de quimiocina cc (CCR) 4, CCR7, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor-1 del factor de crecimiento fibroblástico rico en cisteínas (CFR-1), c-Met, c-Myc, colágeno, CTA, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), CTLA-4, citoqueratina-18, DF3, cadherina-E, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, EGFR2 (HER2), EGFR3 (HER3), EGFR4 (HER4), endoglina, molécula de adhesión de células epiteliales (EpcAM), receptor de proteína-C endotelial (EPCR), efrina, receptor de efrina (Eph), EphA2, endoteliasa-2 (ET2), FAM3D, proteína activadora de fibroblastos (FAP), homólogo-1 de receptor de Fc (FcRH1), ferritina, factor-8 de crecimiento fibroblástico (FGF8), receptor de FGF8, FGF básico (bFGF), receptor de bFGF, receptor de FGF (FGFR) 3, FGFR4, FLT1, FLT3, receptor de folato, homólogo de Frizzled-10 (FZD10), receptor de Frizzled-4 (FZD-4), G250, receptor de G-CSF, gangliósido (por ejemplo, GD2, GD3, GM2, GM3 o similar), globo H, gp75, gp88, GPR-9-6, heparanasa I, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), receptor de HGF, antígeno HLA (por ejemplo, HLA-DR o similar), HM1.24, glóbulos de grasa de leche humana (HMFG), hRS7, proteína de choque térmico 90 (hsp90), epítipo idiótipo, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), receptor de IGF (IGFR),

interleucina (por ejemplo, IL-6, IL-15 o similar), receptor de interleucina (por ejemplo, IL-6R, IL-15R o similar), integrina, proteína-4 asociada a traslocación de receptor inmunológico (IRTA-4), calcitreína 1, KDR, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KS1/4, lamp-1, lamp-2, laminina-5, Lewis-Y, sialil Lewis-X, receptor de linfotóxina-beta (LTBR), LUNX, proteoglicano condroitín-sulfato asociado a melanoma (MCSP), mesotelina, MICA, receptor de sustancia inhibidora mulleriana de tipo II (MISIIR), mucina, molécula de adhesión a células neurales (NCAM), Necl-5, Notch1, osteopontina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de PDGF, factor plaquetario 4 (PF-4), fosfatidilserina, antígeno específico prostático (PSA), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno membranario específico de próstata (PSMA), proteína/péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), receptor activador de ligando NF-kappaB (RANKL), receptor de motilidad mediada por ácido hialurónico (RHAMM), ROBO1, SART3, semaforina 4B (SEMA4B), inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI), SM5-1, esfingosina-1-fosfato, glucoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72), receptor de transferrina (TfR), TGF-beta, Thy-1, Tie-1, receptor de Tie2, dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 1 (TIM-1), factor tisular humano (hTF), antígeno Tn, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor de TNF, ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptor de TRAIL (por ejemplo, DR4, DR5 o similares), transportador de aminoácidos 2 del sistema ASC (ASCT2), trkC, TROP-2, receptor TWEAK Fn14, colagenasa de tipo IV, receptor de urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 o similar), vimentina, VLA-4, y similares.

El anticuerpo puede ser cualquiera de anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal. Entre los ejemplos de la clase de anticuerpo puede incluirse inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE) e inmunoglobulina M (IgM) e IgG resulta preferente. Además, entre los ejemplos de la subclase de IgG puede incluirse IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

El anticuerpo puede incluir además un fragmento que incluye una parte del anticuerpo, o similar, y entre los ejemplos del mismo puede incluirse Fab (fragmento de unión a antígeno), Fab', F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv estabilizado por disulfuro (dsFv), una proteína de fusión que incluye una región Fc de anticuerpo y similares.

Entre los ejemplos del anticuerpo pueden incluirse anticuerpos preparados mediante la técnica de recombinación genética, o similares, es decir, anticuerpos obtenidos mediante introducción de un vector que expresa anticuerpo con gen de anticuerpo insertado, en una célula hospedadora, además de anticuerpos producidos por células de hibridoma que se preparan a partir de células de bazo de un animal inmunizado después de la inmunización del animal con un antígeno. Entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluir un anticuerpo producido por un hibridoma, anticuerpo quimérico humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano y similares.

El anticuerpo quimérico humano se refiere a un anticuerpo que está compuesto de una región variable de cadena pesada (en lo sucesivo, la cadena pesada se denomina cadena H, y la región variable se denomina región V, es decir, HV o VH) y una región variable de cadena ligera (en lo sucesivo, la cadena ligera se denomina cadena L, es decir, LV o VL) de un anticuerpo de un animal no humano, y la región constante de cadena pesada (en lo sucesivo, la región constante se denomina región C, es decir, CH) y la región constante de cadena ligera (en lo sucesivo, denominada CL) de un anticuerpo humano. Como animal no humano, puede utilizarse cualquier animal, por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, conejos o similares, con la condición de que puedan utilizarse para producir un hibridoma.

El anticuerpo quimérico humano puede producirse mediante la obtención de ADNc codificantes de VH y VL de un hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal, la construcción de un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano mediante la inserción de los mismos en un vector de expresión para células hospedadoras que presenta genes codificantes de CH de anticuerpo humano y de CL de anticuerpo humano, y la introducción de los mismos en células hospedadoras para expresarlos.

La CH del anticuerpo quimérico humano puede ser cualquiera perteneciente a las inmunoglobulinas humanas (en adelante denominadas hIg) y resultan preferentes las de la clase hIgG. Además, puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hIgG, tal como hIgG1, hIgG2, hIgG3 o hIgG4. Además, la CL del anticuerpo quimérico humano puede ser cualquiera perteneciente a hIg, y pueden utilizarse las de clase κ o λ.

Entre los ejemplos del anticuerpo humanizado puede incluirse una región determinante de complementariedad de tipo humano (en adelante denominados anticuerpos injertados con CDR que se preparan mediante injerto de una secuencia de aminoácidos de CDR de VH y VL del anticuerpo del animal no humano en una región apropiada de VH y VL del anticuerpo humano).

El anticuerpo con injerto de CDR puede producirse mediante la construcción de ADNc codificantes de regiones V en las que secuencias de CDR de VH y VL del anticuerpo del animal no humano se han injertado en secuencias de CDR de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, construyendo un vector de expresión de anticuerpo con injerto de CDR mediante la inserción de las mismas en un vector de expresión para células hospedadoras que presenta genes codificantes de CH de anticuerpo humano y de CL de anticuerpo humano y la expresión del

anticuerpo con injerto de CDR humano mediante la introducción del vector de expresión en las células hospedadoras.

5 La CH del anticuerpo con injerto de CDR humano puede ser cualquiera perteneciente a hlg. Resultan preferentes los de la clase hlgG. Además, puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 o hlgG4. Además, la CL del anticuerpo con injerto de CDR puede ser cualquiera perteneciente a hlg, y pueden utilizarse las de clase κ o λ .

10 El anticuerpo humano, por ejemplo, puede obtenerse mediante aislamiento de un linfocito de sangre periférica humana, infección del mismo con virus de EB o similar para inmortalizarlo, seguido de la clonación, cultivo del linfocito capaz de producir el anticuerpo, seguido de la purificación del anticuerpo a partir del caldo de cultivo.

15 El anticuerpo humano puede prepararse a partir de la biblioteca fágica de anticuerpos humanos. La biblioteca fágica de anticuerpos humanos en la que se expresan fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, scFv y similares sobre la superficie fágica mediante la inserción de un gen de anticuerpo preparado a partir de células B humanas en un gen fágico. A partir de la biblioteca, puede recuperarse un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que presenta una actividad de unión a antígeno, utilizando su actividad para unirse a un antígeno en fase sólida como marcador. El fragmento de anticuerpo puede convertirse adicionalmente en una molécula de anticuerpo humano compuesta de dos cadenas H completas y dos cadenas L completas.

20 El anticuerpo humano puede producirse mediante la obtención de ADNc codificantes de VL y VH a partir de un hibridoma productor de anticuerpo humano, insertándolo en un vector de expresión para células animales que incluye ADN codificantes de CL y CH de un anticuerpo humano en el que se han sustituido uno o más residuos aminoácidos de tipo salvaje (en adelante denominados WT) por residuos de Cys mediante el método adecuado anteriormente descrito, introduciendo seguidamente el vector en una célula animal para expresar el anticuerpo.

30 El hibridoma productor de anticuerpo humano puede obtenerse a partir del animal transgénico productor de anticuerpo humano siguiendo un método de producción de hibridoma habitualmente utilizado en mamíferos no humanos. El animal transgénico productor de anticuerpo humano es un animal en el que se ha introducido un gen de anticuerpo humano en las células. Específicamente, el animal transgénico productor de anticuerpo humano puede producirse mediante la introducción de un gen de anticuerpo humano en una célula ES de ratón, trasplantando la célula ES en un embrión de estadio temprano de ratón y seguidamente generándolo [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722(2000)].

35 Alternativamente, el anticuerpo humano puede producirse mediante la obtención de ADNc codificantes de VL y VH de un hibridoma productor de anticuerpo humano, inserción de los mismos en un vector de expresión para células animales que incluye ADN codificantes de CL y CH de un anticuerpo humano, la sustitución de uno o más residuos aminoácidos de WT por residuos de Cys mediante el método adecuado anteriormente descrito para construir un vector de expresión de anticuerpo humano, seguido de la introducción del vector de expresión de anticuerpo humano en una célula animal para expresar el anticuerpo.

45 La CH de WT utilizada en el anticuerpo humano puede ser cualquiera perteneciente a hlg. Resultan preferentes los de la clase hlgG. Además, puede utilizarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 o hlgG4. Además, la CL de anticuerpo humano puede ser cualquiera perteneciente a hlg, y pueden utilizarse las de clase κ o λ .

Entre los ejemplos específicos de los anticuerpos producidos mediante el método de la presente invención pueden incluirse, aunque sin limitación particular, los anticuerpos siguientes.

50 Entre los ejemplos de los anticuerpos que reconocen antígenos asociados a tumor pueden incluirse el anticuerpo anti-GD2 [Anticancer Res., 13, 331 (1993)], el anticuerpo anti-GD3 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 260 (1993)], el anticuerpo anti-GM2 [Cancer Res., 54, 1511 (1994)], el anticuerpo anti-HER2 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992), US5725856], el anticuerpo anti-CD52 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)], el anticuerpo anti-MAGE [British J. Cancer, 83, 493 (2000)], el anticuerpo anti-HM 1.24 [Molecular Immunol., 36, 387 (1999)], el anticuerpo del péptido relacionado con la hormona antiparatiroidea [Cancer, 88, 2909 (2000)], el anticuerpo anti-bFGF, el anticuerpo anti-FGF-8 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911 (1989)], el anticuerpo anti-bFGFR, el anticuerpo anti-FGF-8R [J. Biol. Chem., 265, 16455 (1990)], el anticuerpo anti-IGF [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)], el anticuerpo anti-IGF-IR [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)], el anticuerpo anti-PSMA [J. Urology, 160, 2396 (1998)], el anticuerpo anti-VEGF [Cancer Res., 57, 4593 (1997)], el anticuerpo anti-VEGFR [Oncogene, 19, 2138 (2000), la publicación de patente internacional nº WO 96/30046], el anticuerpo anti-CD20 [Curr. Opin. Oncol., 10, 548 (1998), patente nº US 5736137], el anticuerpo anti-CD10, el anticuerpo anti-EGFR (publicación de patente internacional nº WO 96/402010), el anticuerpo anti-Apo-2R (publicación de patente internacional nº WO 98/51793), el anticuerpo anti-ASCT2 (publicación de patente internacional nº WO 2010/008075), el anticuerpo anti-CEA [Cancer Res., 55 (23 supl.):5935s-5945s, (1995)], el anticuerpo anti-CD38, el anticuerpo anti-CD33, el anticuerpo anti-CD22, el anticuerpo anti-EpCAM, el anticuerpo anti-A33 y similares.

- Entre los ejemplos de anticuerpos que reconocen antígenos asociados a alergia o a inflamación pueden incluirse el anticuerpo anti-interleucina-6 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)], el anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 [Molecular Immunol., 31, 371 (1994)], el anticuerpo anti-interleucina-5 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)], el anticuerpo anti-receptor de interleucina-5, el anticuerpo anti-interleucina-4 [Cytokine, 3, 562 (1991)], el anticuerpo anti-receptor de interleucina-4 [J. Immunol. Methods, 217, 41 (1998)], anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [Hybridoma, 13, 183 (1994)], anticuerpo anti-receptor de factor de necrosis tumoral [Molecular Pharmacol., 58, 237 (2000)], anticuerpo anti-CCR4 [Nature, 400, 776 (1999)], anticuerpo anti-quimiocina (Peri et al., J. Immunol. Meth., 174, 249, 1994) o anticuerpo anti-receptor de quimiocina [J. Exp. Med., 186, 1373 (1997)] y similares.
- Entre los ejemplos de los anticuerpos que reconocen los antígenos asociados a enfermedad cardiovascular pueden incluirse anticuerpo anti-GPIIb/IIIa [J. Immunol., 152, 2968 (1994)], anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas [Science, 253, 1129 (1991)], anticuerpo anti-receptor de crecimiento derivado de plaquetas [J. Biol. Chem., 272, 17400 (1997)], anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea [Circulation, 101, 1158 (2000)], anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti- α V β 3, anticuerpo de α 4 β 7 y similares.
- Entre los ejemplos de los anticuerpos que reconocen antígenos asociados a infección vírica o bacteriana pueden incluirse el anticuerpo anti-gp120 [Structure, 8, 385 (2000)], el anticuerpo anti-CD4 [J. Rheumatology, 25, 2065 (1998)], el anticuerpo anti-CCR5 y el anticuerpo anti-verotoxina [J. Clin. Microbiol., 37, 396 (1999)] y similares.
- Además, la presente exposición se refiere a una sustancia fisiológicamente activa producida mediante el cultivo de células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación de disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, caracterizado por la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.
- Además, la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, y un método para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa.
- Con la condición de que el método de filtración a través de membrana sea un método de pasar la disolución acuosa para el tratamiento a través de una membrana porosa mediante presión para eliminar componentes, partículas, impurezas o similares en la solución, el método no se encuentra particularmente limitado. El método es preferentemente microfiltración, ultrafiltración, diálisis, electrodiálisis u ósmosis inversa, más preferentemente microfiltración, ultrafiltración o diálisis, y particularmente preferentemente microfiltración.
- Una membrana de filtración utilizada en la filtración de membrana incluye, aunque sin limitación particular, y preferentemente una membrana de microfiltración, una membrana de ultrafiltración, una membrana de diálisis, una membrana de electrodiálisis o una membrana de ósmosis inversa, más preferentemente una membrana de microfiltración, una membrana de ultrafiltración, una membrana de diálisis y particularmente preferentemente una membrana de microfiltración.
- El material de la membrana de filtración incluye, aunque sin limitación particular, por ejemplo, acetato de celulosa, poliamida aromática, poliácridonitrilo, cloruro de polivinilo, copolímero de cloruro de polivinilo-poliácridonitrilo, polisulfona, poliéter sulfona (PES), fluoruro de polivinilideno (PVDF), cerámica, alcohol polivinílico, difluoruro de polivinilideno, éster mixto de acetato de celulosa y nitrato de celulosa, politetrafluoroetileno, alúmina, copolímero de estireno-divinilbenceno, TEFRON (marca comercial registrada) o similares, o derivados de los mismos o similares. Entre ellos, resulta preferente la polietersulfona, el fluoruro de polivinilideno o similares.
- Entre los ejemplos específicos de la membrana de filtración utilizando poliéter sulfona o derivado de la misma puede incluirse, por ejemplo, filtros de membrana Millipore Express (marca comercial registrada) PLUs (tamaño de poro: 0,22 o 0,45 μ m) (fabricados por Millipore), filtros de cartucho SHC Millipore Express (fabricados por Millipore), filtros de cartucho SHR Millipore Express (fabricados por Millipore), Supor EBV (fabricado por Pall Corp.), EKV (fabricado por Pall Corp., nº de catálogo: AB3EKV7PH4), Supor EBV (fabricado por Pall Corp.), Supor Life 200 (fabricado por Pall Corp.), Zarutopoa (marca comercial registrada) 2 (estructura de la membrana: membrana bicapa, tamaño de poro: 0,2+0,1, 0,45+0,2 o 0,8+0,45 μ m) (Fabricada por Sartorius Stedim Biotech), Zarutopoa (marca comercial registrada) 2 XLG (estructura de la membrana: membrana bicapa, tamaño de poro: 0,8+0,2 μ m) (fabricada por Sartorius Stedim Biotech), Zarutopoa (marca comercial registrada) 2 XLI (estructura de la membrana: membrana bicapa, tamaño de poro: 0,35+0,2 μ m) (fabricada por Sartorius Stedim Biotech), Zarutopoa 2 High Flow (fabricada por Sartorius Stedim Biotech), filtros de cartucho de membrana PES TCS (tamaño de poro: 0,20 o 0,45 μ m) (fabricada por ADVANTEC) o similares.
- Entre los ejemplos específicos de la membrana de filtración utilizando fluoruro de polivinilideno o derivado del mismo pueden incluirse, por ejemplo filtros de membrana Millipore Express (marca comercial registrada) (tamaño de poro: 0,10, 0,22, 0,45, 0,65 o 5,0 μ m) (fabricados por Millipore), cartucho de filtro hidrofílico gV II (fabricado por Millipore), cartucho de filtro hidrófilo VV Durapore II (fabricado por Millipore), Furorodain (marca comercial registrada) II-DFLP (fabricado por Pall Corp.), Furorodain II-DBLP (fabricado por Pall Corp.), Furorodain II-DJLP

(fabricado por Pall Corp.), Ultipor VF-DV 20 (fabricado por Pall Corp.), Ultipor VF-DV 50 (fabricado por Pall Corp.), o similares.

5 Además, entre los ejemplos específicos de la membrana de filtración en combinación con poliéter sulfona o derivado del mismo y fluoruro de polivinilideno o derivado del mismo puede incluirse, por ejemplo, Fluorodyne (marca comercial registrada) Exgrade EDF cartucho de filtro de membrana (fabricado por Pall Corp., nº de catálogo: AB3UEDF7PH4) o similar.

10 Además, entre los ejemplos específicos de la membrana de filtración utilizando materiales de membrana diferentes de poliéter sulfona o fluoruro de polivinilideno pueden incluirse, por ejemplo, filtros de membrana Omnipore (marca comercial registrada) (tamaño de poro: 0,1, 0,2, 0,45, 1,0, 5,0 o 10 μm) (fabricados por Millipore), MF-Millipore (marca comercial registrada) (tamaño de poro: 0,025, 0,05, 0,1, 0,22, 0,3, 0,45, 0,65, 0,8, 1,2, 3, 5 o 8 μm) (fabricado por Millipore), filtros de membrana de nilón (tamaño de poro: 0,20 o 5,0 μm) (fabricados por Millipore),
 15 Ultipor N66 (tamaño de poro: 0,2 o 0,45 μm) (fabricado por Pall Corp.), Pojidain (marca comercial registrada) (tamaño de poro: 0,10, 0,20, 0,3 o 0,45 μm) (fabricado por Pall Corp.), Varafine VFSP (tamaño de poro: 0,2 o 0,45 μm) (fabricado por Pall Corp.), Varafine VFSP (tamaño de poro: 0,02, 0,1 o 0,2 μm) (fabricado por Pall Corp.), Varafine VFSG (tamaño de poro: 0,02, 0,1 o 0,2 μm) (fabricado por Pall Corp.), Zarutoron (fabricado por Sartorius Stedim Biotech), filtros de cartucho de membrana de acetato TCR (tamaño de poro: 0,20, 0,45 o 8,0 μm) (fabricado por Advantec), filtros de cartucho Yumicron (tamaño de poro: 0,2, 0,4, 0,6, 0,9 o 2,5 μm) (fabricado por Yuasa Membrane Systems Co., Ltd.) o similares.

20 El tamaño de poro de la membrana de filtración es, aunque sin limitación particular, preferentemente de 1 nm a 100 μm , más preferentemente de 5 nm a 10 μm , preferentemente de 10 nm a 1 μm , y particularmente preferente de 0,1 μm a 0,5 μm . Un ejemplo específico del tamaño de poro de membrana puede ser el tamaño de poro del ejemplo específico de membrana de filtración indicado anteriormente.

25 La membrana de filtración puede presentar una estructura que consiste en una única membrana de filtración, tal como una unidad de filtración Millex (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS), o una estructura de dos o más capas que incluye uno o más prefiltros, tal como 0,5/0,2 μm Express SHC Disk W/Typar (fabricado por Millipore, número de catálogo: HGEP02550).

30 Un método para evaluar la filtrabilidad de la disolución acuosa puede incluir, aunque sin limitación particular, por ejemplo, una prueba de $V_{\text{máx}}$ o similar. $V_{\text{máx}}$ (L/m^2) es la cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie membranaria que puede obtenerse tras un tiempo infinito después del inicio de la filtración, y puede medirse mediante el método descrito en BioPharm, 46, septiembre de 1995.

35 Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa en la que se prepara la disolución acuosa que incluye el agente quelante, mediante la adición del agente quelante a la disolución acuosa para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa.
 40 Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa en la que la disolución acuosa que incluye el agente quelante y el medio de cultivo se preparan mediante adición del agente quelante y el medio de cultivo a la disolución acuosa para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa.

45 Además, la presente invención se refiere a un método para producir una sustancia fisiológicamente activa mediante la preparación de la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, mediante adición del agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa, y llevando a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa y después cultivando las células con la disolución acuosa resultante.

50 Ejemplos

A continuación en la presente memoria, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

55 [Ejemplo 1] Efecto del agente quelante sobre la mejora de la filtrabilidad

Los efectos de diversos agentes quelantes sobre la filtrabilidad de una disolución acuosa al añadirla durante la preparación de la disolución acuosa que incluye un medio de cultivo en polvo, se examinaron a fin de demostrar la mejora del valor de $V_{\text{máx}}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana).

La preparación de la disolución acuosa se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, cada 2,0 g de dihidrato de citrato trisódico (fabricado por Kozakai Pharmaceutical Co.), ácido L-málico (fabricado por Wako, número de catálogo: 138-07512) o sal sódica hierro (III) de ácido etilendiaminotetraacético (en adelante denominada sal sódica de EDTA-hierro (III)) (fabricada por Sigma-Aldrich, número de catálogo: EDFS-100G) se añadió como agente quelante a 900 ml de agua pura (en adelante denominada AP), seguido de agitación. Cada

pH tras la disolución completa del agente quelante era de 8,41 para la disolución con adición de dihidrato de citrato trisódico, 2,57 para la disolución con adición de ácido L-málico y 5,11 para la disolución con adición de sal sódica de EDTA-hierro (III).

5 A continuación, se añadieron 6,7 g de SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, número de catálogo: 91052-1K3986), seguido de la agitación durante aproximadamente 15 minutos. Se añadieron 22,6 g de medio de cultivo en polvo mejorado EX-CELL 302 (fabricado por SAFC Bioscience) que contenía aminoácidos, sales metálicas y vitaminas, y 0,5 ml de disolución de metotrexato 1 mmol/l (fabricada por Sigma Aldrich, número de catálogo: M8407-500MG) disuelta en PBS (fabricada por Invitrogen, número de catálogo: 14190-250), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos.

Además, se añadieron 1,6 g de bicarbonato sódico (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc., número de catálogo: 37116-00) para el ajuste del pH final. Tras agitar durante aproximadamente 5 minutos, se ajustó el volumen a 1 l con AP seguido de agitación durante aproximadamente 10 minutos.

15 Cada concentración de los agentes quelantes añadidos que se han indicado anteriormente, después de la preparación de la disolución acuosa era de 6,8 mmoles/l para el dihidrato de citrato trisódico, 15 mmoles/l para el ácido L-málico y 5,4 mmoles/l para la sal sódica de EDTA-hierro (III).

20 A continuación, se llevó a cabo un ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada, de la manera siguiente. Se introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore). Como filtro de ensayo se utilizó una unidad de filtración Millex (marca comercial registrada) GV (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS) con un tamaño de poro de 0,22 μm . El filtro se conectó a un tanque y se aplicaron 100 kPa de presión mediante aire comprimido.

25 Antes de iniciar el ensayo se abrió ligeramente la válvula en el tanque y se humectó el filtro con la disolución acuosa. Tras humectar el filtro, se inició el ensayo abriendo la válvula por completo. El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

30 Se muestran los resultados en la fig. 1. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 452 para la disolución acuosa a la que no se había añadido agente quelante, pero se incrementó a 1.931 para la disolución acuosa a la que se había añadido dihidrato de citrato trisódico como agente quelante; a 2.483 para la disolución acuosa a la que se había añadido ácido L-málico como agente quelante, y 1.834 para la disolución acuosa a la que se había añadido sal sódica de EDTA-hierro (III) como agente quelante.

40 Estos resultados muestran que el valor de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa puede incrementarse mediante la adición del agente quelante durante la preparación de la disolución acuosa.

[Ejemplo 2] Temporización de la adición y efecto de mejora de la filtrabilidad del dihidrato de citrato trisódico

45 La temporización de la adición y efecto de mejora de la filtrabilidad del dihidrato de citrato trisódico durante la preparación de la disolución acuosa que incluye un medio de cultivo en polvo se examinaron a fin de demostrar que la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) podía incrementarse en gran medida mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico junto con o antes del medio de cultivo en polvo que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas o similares. También se demostró que la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) puede incrementarse mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico antes del ajuste del pH final.

50 La preparación de la disolución acuosa se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente, excepto la adición de dihidrato de citrato trisódico. En primer lugar, se añadieron 6,7 g de HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, número de catálogo: 91052-5K3986) a 900 ml de agua pura (en adelante denominada AP), seguido de agitación durante aproximadamente 15 minutos.

55 Se disolvieron 22,6 g de EX-CELL 302 mejorado (fabricado por SAFC Bioscience) que contenía aminoácidos, sales metálicas y vitaminas, y 0,5 ml de disolución de metotrexato 1 mmol/l (fabricada por Sigma Aldrich, número de catálogo: M8407-500MG) disuelta en PBS (fabricada por Invitrogen, número de catálogo: 14190-250), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos.

60 Además, se añadieron 1,6 g de bicarbonato sódico (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc., número de catálogo: 37116-00) para el ajuste del pH final. Tras agitar durante aproximadamente 5 minutos, se ajustó el volumen a 1 l con AP y la mezcla se agitó adicionalmente durante aproximadamente 10 minutos.

Durante el procedimiento de preparación de la disolución acuosa, se añadió dihidrato de citrato trisódico (fabricado por Kozakai Pharmaceutical Co.) en los puntos temporales de las condiciones A a H siguientes para preparar las disoluciones acuosas. La concentración del dihidrato de citrato trisódico añadido tras la preparación de la disolución acuosa indicada anteriormente era 0,1 g/l (0,34 mmoles/l).

Condición A: ninguna adición

Condición B: 10 minutos antes de la adición de SOY HYDROLYSATE UF

Condición C: 1 minuto antes de la adición de SOY HYDROLYSATE UF

Condición D: adición concurrente de SOY HYDROLYSATE UF

Condición E: 10 minutos antes de la adición de EX-CELL 302 mejorado

Condición F: adición concurrente de EX-CELL 302 mejorado

Condición G: 15 minutos antes de la adición de bicarbonato sódico

Condición H. inmediatamente después de la preparación de 1 l de disolución con AP

A continuación, se llevó a cabo un ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada, de la manera siguiente. Se introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore), unidad de filtración GV Millex (marca comercial registrada) (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS) con un tamaño de poro de 0,22 μm . El filtro se conectó a un tanque y se aplicaron 100 kPa de presión mediante aire comprimido. Antes de iniciar el ensayo se abrió ligeramente la válvula en el tanque y se humectó el filtro con la disolución acuosa. Tras humectar el filtro, se inició el ensayo abriendo la válvula por completo.

El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

Se muestran los resultados en la figura 2. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 1.163 bajo la Condición A, de 3.199 bajo la Condición B, de 3.652 bajo la Condición C, 3.783 bajo la Condición D, 3.060 bajo la Condición E y 3.581 bajo la Condición F, indicando que la filtrabilidad de la disolución acuosa podía mejorarse en gran medida mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico junto con o antes del EX-CELL 302 mejorado.

Además, el valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 2.502 bajo la Condición G, indicando que la filtrabilidad de la disolución acuosa puede mejorarse mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico antes de la adición de bicarbonato sódico como procedimiento de ajuste del pH. Por otra parte, el valor de $V_{m\acute{a}x}$ era de 1.441 bajo la Condición H de adición de dihidrato de citrato trisódico tras el ajuste del pH, indicando que la mejora de la filtrabilidad de la disolución acuosa era equivalente o ligeramente superior a la de la Condición A.

Estos resultados demostraron que la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) de la disolución acuosa puede incrementarse mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico antes del procedimiento de ajuste del pH final. Además, en particular, puede incrementarse la $V_{m\acute{a}x}$ mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico junto con o antes del medio de cultivo en polvo que contiene aminoácidos, sales metálicas, vitaminas o similares.

[Ejemplo 3] Correlación entre la concentración de dihidrato de citrato trisódico añadido y la filtrabilidad de la disolución acuosa

La correlación entre filtrabilidad y concentración del dihidrato de citrato trisódico añadido durante la preparación de la disolución acuosa se examinó con el fin de demostrar que la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) se incrementaba de una manera dependiente de la concentración.

La preparación de la disolución acuosa se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se añadieron 0 g (ninguna adición), 0,1 g o 1,0 g de dihidrato de citrato trisódico (fabricado por Kozakai Pharmaceutical Co.) a 900 ml de agua pura (en adelante denominada AP) y se agitó. Tras disolver por completo el dihidrato de citrato trisódico, se añadieron 6,7 de SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, número de catálogo: 91052-1K3986), seguido de la agitación durante aproximadamente 15 minutos.

Se añadieron 22,6 g de EX-CELL 302 mejorado (fabricado por SAFC Bioscience) que contenía aminoácidos, sales metálicas y vitaminas, y similares, y 0,5 ml de disolución de metotrexato 1 mmol/l (fabricada por Sigma Aldrich, número de catálogo: M8407-500MG) disueltos PBS (fabricado por Invitrogen, número de catálogo: 14190-250), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos.

Además, se añadieron 1,6 g de bicarbonato sódico (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc., número de catálogo: 37116-00) para el ajuste del pH final. Tras agitar durante aproximadamente 5 minutos, se ajustó el volumen a 1 l con AP seguido de agitación durante aproximadamente 10 minutos. La concentración del dihidrato de citrato

trisódico añadida indicada anteriormente tras la preparación de la disolución acuosa era 0 g/l (ninguna adición), 0,1 g/l (0,34 mmoles/l o 1,0 g/l (3,4 mmoles/l).

5 A continuación, se llevó a cabo un ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada, de la manera siguiente. Se introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore). Como filtro de ensayo se utilizó una unidad de filtración Millex (marca comercial registrada) GV (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS) con un tamaño de poro de 0,22 μm . El filtro se conectó a un tanque y se aplicaron 100 kPa de presión mediante aire comprimido.

10 Antes de iniciar el ensayo se abrió ligeramente la válvula en el tanque y se humectó el filtro con la disolución acuosa. Tras humectar el filtro, se inició el ensayo abriendo la válvula por completo. El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico
15 mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

Se muestran los resultados en la figura 3. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 452 para la disolución acuosa a la que no se había añadido ningún agente quelante, pero se incrementó a 1.706 para la disolución acuosa a la que se habían añadido 0,1 g/l de dihidrato de citrato trisódico y de 2.588 para la disolución acuosa a la que se había
20 añadido 1,0 g/l de dihidrato de citrato trisódico.

Estos resultados demostraron que el valor de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa puede incrementarse según la concentración de dihidrato de citrato trisódico mediante la adición del mismo como agente quelante antes del ajuste
25 del pH final de la disolución acuosa.

[Ejemplo 4] Efecto de mejora de la filtrabilidad independiente del material de membrana/estructura de la membrana utilizando agente quelante

30 En la preparación de la disolución acuosa que contenía el medio de cultivo en polvo, se examinaron los efectos de mejora de la filtrabilidad de los agentes quelantes mediante la utilización de una pluralidad de membranas de filtración. Como resultado, se reveló que el valor de la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) puede mejorarse con una membrana de fluoruro de polivinilideno (en adelante denominado PVDF) con un tamaño de poro de 0,22 μm , o con una membrana de PES con un tamaño de poro de
35 0,2 μm (en adelante denominada membrana PES de 0,5/0,2 μm de tamaño de poro) en combinación con membranas de poliéter sulfona (en adelante denominada PES) con un tamaño de poro de 0,5 μm como prefiltro.

La preparación de la disolución acuosa se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se añadieron 0 g (ninguna adición), 0,1 g de dihidrato de citrato trisódico (fabricado por Kozakai Pharmaceutical Co.)
40 a 900 ml de agua pura (en adelante denominada AP) y se agitó. Tras disolver por completo el dihidrato de citrato trisódico, se añadieron 6,7 de SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, número de catálogo: 91052-1K3986 o 91052-5K3986), seguido de agitación durante aproximadamente 15 minutos.

Se añadieron 22,6 g de medio de cultivo en polvo EX-CELL 302 (fabricado por SAFC Bioscience) que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares, y 0,5 ml de disolución de metotrexato 1 mmol/l (fabricada por Sigma Aldrich, número de catálogo: M8407-500MG) disuelta en PBS (fabricada por Invitrogen, número de catálogo: 14190-250), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos. Además, se añadieron 1,6 g de bicarbonato sódico (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc., número de catálogo: 37116-00) para el ajuste del pH
50 final. Tras agitar durante aproximadamente 5 minutos, se ajustó el volumen a 1 l con AP seguido de agitación adicional durante aproximadamente 10 minutos. La concentración del dihidrato de citrato trisódico añadido indicada anteriormente tras la preparación de la disolución acuosa era 0 g/l (ninguna adición) o 0,1 g/l (0,34 mmoles/l).

A continuación, se llevó a cabo el ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada mediante el procedimiento siguiente utilizando la unidad de filtración GV de membrana de PVDF Millex (marca comercial registrada) (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS) con un tamaño de poro de 0,22 μm como filtro de ensayo. Se
55 introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore). El filtro se conectó a un tanque y se aplicaron 100 kPa de presión mediante aire comprimido.

60 Antes de iniciar el ensayo se abrió ligeramente la válvula en el tanque y se humectó el filtro con la disolución acuosa. Tras humectar el filtro, se inició el ensayo abriendo la válvula por completo. El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico
65 mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

Además, se llevó a cabo un ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada mediante el procedimiento siguiente, utilizando Express SHC Disk W/Typar 0,5/0,2 μm (fabricado por Millipore, número de catálogo: HGEP02550), que es una membrana de PES con un tamaño de poro de 0,5/0,2 μm como filtro de ensayo. Se introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore).

El filtro de ensayo humectado suficientemente con AP se unió a un soporte (fabricado por Millipore) y el soporte se conectó a un tanque de presión. Se extrajo por completo el aire por la válvula de ventilación mediante la apertura de la válvula incluida en el soporte. Tras aplicar 120 kPa de presión con aire comprimido en el tanque presurizado, se inició el ensayo mediante la apertura completa de la válvula.

El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

Se muestran los resultados en la fig. 4. Con respecto a la filtración utilizando la membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 μm , el valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 957 para la disolución acuosa a la que no se había añadido dihidrato de citrato trisódico, pero se incrementó a 3.199 para la disolución acuosa a la que se había añadido dihidrato de citrato trisódico. Además, con respecto a la filtración utilizando la membrana de PES con un tamaño de poro de 0,5/0,2 μm , el valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 1511 para la disolución acuosa a la que no se había añadido dihidrato de citrato trisódico, pero se incrementó a 3.922 para la disolución acuosa a la que se había añadido dihidrato de citrato trisódico.

Estos resultados demuestran que la filtrabilidad de la disolución acuosa puede mejorarse mediante la adición del agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa, con independencia del material de membrana utilizado, tal como PVDF o PES. También se reveló que la filtrabilidad de la disolución acuosa puede mejorarse mediante la adición del agente quelante antes del ajuste del pH final de la disolución acuosa, con independencia de la estructura de la membrana que se utiliza, tal como de una sola capa o de una pluralidad de capas, preparada en combinación con el prefiltro.

[Ejemplo 5] Cultivo de células animales y producción de sustancia fisiológicamente activa utilizando la disolución acuosa preparada mediante la adición de agente quelante antes del ajuste del pH final

Se llevó a cabo el cultivo de células animales utilizando la disolución acuosa preparada mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico antes del ajuste del pH final. Como resultado, en la disolución acuosa a la que se había añadido dihidrato de citrato trisódico, el crecimiento y títulos celulares eran equivalentes o superiores a los observados en la disolución acuosa a la que no se había añadido dihidrato de citrato trisódico.

El procedimiento de preparación de 1 l de disolución acuosa de producción se describe a continuación.

En primer lugar, se añadieron 0 g (ninguna adición), 0,1 g de dihidrato de citrato trisódico (fabricado por Kozakai Pharmaceutical Co.) a aproximadamente 900 ml de agua pura (en adelante denominada AP) y se agitó. Tras disolver por completo el dihidrato de citrato trisódico, se añadieron 6,7 de SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience, número de catálogo: 91052-1K3986 o 91052-5K3986), seguido de agitación durante aproximadamente 15 minutos.

Se añadieron 22,6 g de medio de cultivo en polvo mejorado EX-CELL 302 (fabricado por SAFC Bioscience) que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares, y 0,5 ml de disolución de metotrexato 1 mmol/l (fabricada por Sigma Aldrich, número de catálogo: M8407-500MG) disuelta en PBS (fabricada por Invitrogen, número de catálogo: 14190-250), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos.

Además, se añadieron 1,6 g de bicarbonato sódico (fabricado por Kanto Chemical Co., Inc., número de catálogo: 37116-00) para el ajuste del pH final. Tras agitar durante aproximadamente 5 minutos, se ajustó el volumen a 1 l con AP seguido de agitación durante aproximadamente 10 minutos para preparar la disolución acuosa de producción. La concentración del dihidrato de citrato trisódico añadido indicada anteriormente tras la preparación de la disolución acuosa era 0 g/l (ninguna adición) o 0,1 g/l (0,34 mmoles/l).

Se cultivaron por lotes alimentados células CHO que expresan anticuerpo monoclonal utilizando la disolución acuosa de producción preparada mediante el procedimiento anteriormente descrito, en un reactor de 3 l durante 14 días. La densidad de siembra en el estadio inicial de cultivo fue de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/ml y la temperatura y pH de la disolución acuosa para el cultivo durante el periodo de cultivo se controló en 35°C y 7,10, respectivamente.

La disolución acuosa de alimentación consistía en aminoácidos [L-alanina, monohidrocloreto de L-arginina, monohidrato de L-asparagina, dihidrocloreto de L-cistina, ácido L-glutámico, dihidrato de monohidrocloreto de L-

5 histidina, L-isoleucina, L-leucina, monohidrócloruro de L-lisina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, dihidrato disódico de L-tirosina, L-valina (todos fabricados por Sigma Aldrich), ácido L-aspártico, glicina (todos fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), L-alanil-L-glutamina (fabricada por Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.) y L-metionina (fabricada por Junsei Chemical Co.), vitaminas [D-biotina, pantotenato de D-calcio, cloruro de colina, ácido fólico, mioinositol, niacinamida, hidrócloruro de piridoxal, riboflavina, hidrócloruro de tiamina, cianocobalamina (todos fabricados por Sigma Aldrich)], insulina humana recombinante (fabricada por JRH Bioscience), etanolamina (fabricada por Sigma Aldrich), SOY HYDROLYSATE UF (fabricado por SAFC Bioscience), disolución concentrada lipídica de colesterol (solución acuosa 250x, fabricada por Invitrogen), sal sódica de etilendiaminotetraacético-hierro (II) (fabricado por Sigma Aldrich) y glucosa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La disolución acuosa de alimentación se añadió en una cantidad de aproximadamente 10 6,3% de la disolución acuosa de producción inicial los días 3, 6, 9 y 12 después del cultivo.

15 Como resultado, en el cultivo con la disolución acuosa a la que no se había añadido dihidrato de citrato trisódico, la densidad máxima de células viables alcanzó $5,4 \times 10^6$ células/ml y el título del anticuerpo monoclonal al final del cultivo era de 1,8 g/l, mientras que en el cultivo con la disolución acuosa a la que se habían añadido 0,1 g/l de dihidrato de citrato trisódico, la densidad máxima de células viables alcanzó $5,8 \times 10^6$ células/ml y el título de anticuerpo monoclonal al final del cultivo era de 1,9 g/l.

20 Estos resultados indican que en la disolución acuosa preparada mediante la adición de dihidrato de citrato trisódico antes del ajuste del pH final, el crecimiento y títulos celulares eran equivalentes o superiores a los observados en la disolución acuosa preparada sin adición de dihidrato de citrato trisódico.

25 **[Ejemplo 6] Efecto de mejora de la filtrabilidad mediante la adición de dihidrato de ácido N-acetilneuramínico**

El efecto de la adición de dihidrato de ácido N-acetilneuramínico como agente quelante durante la preparación de la disolución acuosa que contenía un medio de cultivo en polvo sobre la filtrabilidad de la disolución acuosa se examinó a fin de demostrar que podía mejorarse la $V_{m\acute{a}x}$ (cantidad de procesamiento máxima por unidad de superficie de membrana) de la disolución acuosa.

30 La preparación de la disolución acuosa se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se añadieron 4,0 g de hidróxido sódico (fabricado por Junsei Chemical Co., número de catálogo 39155-0301), 4,5 g de sal disódica de L-tirosina (fabricada por Sigma, número de catálogo: T1145-100G) y 6,16 g de dihidrócloruro de L-(-)-cistina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., número de catálogo: 034-05322) a 160 ml de agua pura (en adelante abreviada como AP), seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos y el volumen se ajustó a 200 ml con AP para preparar la disolución acuosa (en adelante abreviada como disolución Cys-Tyr).

35 A continuación, se añadieron 32,6 g de un medio de cultivo en polvo, Efficient Feed A, que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A12870SB), 0,5 ml de un aditivo líquido de disolución de poliamina (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A12872SA), 27,1 g de un medio de cultivo en polvo, Efficient Feed B, que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A11498SA) y 5,0 g de L(+)-glutamina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., número de catálogo: 078-00525), 30,0 g de peptona SE50MAF-UF (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd, número de catálogo: P42474) y 70,0 g de D(+)-glucosa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd, número de catálogo: 041-00595) y 30,9 g de dihidrato de ácido N-acetilneuramínico (fabricado por Kyowahakko Bio Co., Ltd.) como el agente quelante, a 800 ml de AP, seguido de agitación durante aproximadamente 30 minutos.

40 El pH después de la agitación era de 4,05. A continuación, se añadieron 50 ml de disolución Cys-Tyr, seguido de agitación durante aproximadamente 20 minutos. El pH después de la adición de disolución Cys-Tyr era de 4,37. Después, se añadieron 17 ml de disolución de hidróxido sódico 5 moles/l (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., número de catálogo: 196-05375) para el ajuste del pH final, seguido de agitación durante aproximadamente 20 minutos; después, el volumen se ajustó a 1 l con AP para preparar la disolución A. El pH final de la disolución A era de 8,1. La concentración del dihidrato de ácido N-acetilneuramínico añadido que se ha 55 indicado anteriormente después de la preparación de la disolución acuosa era de 30,9 g/l (89 mmoles/l).

60 Por otra parte, a 800 ml de AP, se añadieron 32,6 g de un medio de cultivo en polvo, Efficient Feed A, que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A12870SB), 0,5 ml de un aditivo líquido de disolución de poliamina (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A12872SA), 27,1 g de un medio de cultivo en polvo, Efficient Feed B, que contenía aminoácidos, sales metálicas, vitaminas y similares (fabricado por Life Technologies, número de catálogo: A11498SA) y 5,0 g de L(+)-glutamina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., número de catálogo: 078-00525), 30,0 g de peptona SE50MAF-UF (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd, número de catálogo: P42474) y 70,0 g de D(+)-glucosa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd, número de catálogo: 041-00595) y se añadieron 28 ml de ácido clorhídrico 5 moles/l (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nº de cat. 081-05435) no como agente quelante sino como ácido, seguido de la agitación durante aproximadamente 30 minutos. El pH después 65

de la agitación era de 3,09. A continuación, se añadieron 50 ml de disolución Cys-Tyr, seguido de agitación durante aproximadamente 20 minutos. El pH después de la adición de disolución Cys-Tyr era de 3,39.

5 Después, se añadieron 28 ml de disolución de hidróxido sódico 5 moles/l (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., número de catálogo: 196-05375) para el ajuste del pH final, seguido de agitación durante aproximadamente 20 minutos; después, el volumen se ajustó a 1 l con AP para preparar la disolución B. El pH final de la disolución B era de 8,1.

10 A continuación, se llevó a cabo el ensayo de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa preparada, mediante el procedimiento siguiente. Se introdujo 1 l de la disolución acuosa de ensayo en un tanque presurizado (fabricado por Millipore). Como filtro de ensayo se utilizó una unidad de filtración Millex (marca comercial registrada) GV (fabricada por Millipore, número de catálogo: SLGV033RS) con un tamaño de poro de 0,22 μm .

15 El filtro se conectó al tanque y se aplicaron 100 kPa de presión mediante aire comprimido. Antes de iniciar el ensayo se abrió ligeramente la válvula en el tanque y se humectó el filtro con la disolución acuosa. Tras humectar el filtro, se inició el ensayo abriendo la válvula por completo.

20 El punto temporal de apertura completa de la válvula se fijó en 0 y se midió el tiempo necesario para incrementar en 5 g la cantidad procesada en la filtración. Se consideró que la densidad de la disolución acuosa era de 1 g/ml y se calculó la cantidad de filtración (V) como el peso medido. La medición se llevó a cabo durante más de tres minutos. Se dibujó un gráfico mediante representación de los valores medidos con el tiempo (t) en el eje horizontal y t/V en el eje vertical a fin de calcular la $V_{m\acute{a}x}$ a partir del inverso de la pendiente de la línea recta obtenida.

25 Se muestran los resultados en la fig. 5. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ (L/m^2) era de 190 para la disolución B, al que no se había añadido ningún quelante, pero se incrementó a 2.025 para la disolución A, a la que se había añadido dihidrato de ácido N-acetilneuramínico como el agente quelante.

30 Estos resultados muestran que el valor de $V_{m\acute{a}x}$ de la disolución acuosa puede incrementarse mediante la adición de dihidrato de N-acetilneuramínico como el agente quelante durante la preparación de la disolución acuosa que contiene el medio de cultivo en polvo.

La presente solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa nº 2010-290444, presentada el 27 de diciembre de 2010.

35 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona un método para preparar una disolución acuosa que presenta una filtrabilidad notablemente mejorada. Se proporciona una disolución acuosa altamente versátil que puede filtrarse a través de membrana establemente en un corto tiempo, mediante la utilización del método de preparación. Además, se proporciona una disolución acuosa que presenta una filtrabilidad notablemente mejorada que se prepara mediante el método de preparación; un método para el cultivo de células utilizando la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación; un método para producir una sustancia fisiológicamente activa utilizando el método de cultivo; una sustancia fisiológicamente activa producida mediante el método de producción, un método para llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa que se prepara mediante el método de preparación; un método para mejorar la filtrabilidad de membrana de la disolución acuosa, caracterizado porque la disolución acuosa se prepara mediante la adición de un agente quelante, o un método para producir la sustancia fisiológicamente activa mediante la preparación de la disolución acuosa, llevar a cabo la filtración a través de membrana de la disolución acuosa y después cultivar las células utilizando la disolución acuosa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para preparar una disolución acuosa que presenta una filtrabilidad de membrana mejorada que comprende un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para células animales, y un agente quelante, en el que el método comprende añadir el agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste de pH final de la disolución acuosa, y en el que el agente quelante se añade a una concentración de 0.1 a 100 mmoles/l simultáneamente junto con el medio de cultivo en polvo.
- 10 2. Método para preparar una disolución acuosa según la reivindicación 1, en el que el agente quelante es uno o más seleccionados de entre ácido cítrico, ácido málico, ácido etilendiaminotetraacético, sal sódica hierro (III) de ácido etilendiaminotetraacético, ácido siálico, y sales o hidratos de los mismos.
- 15 3. Método para preparar una disolución acuosa según la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de cultivo en polvo incluye además una o más seleccionadas de entre sales metálicas, azúcares y vitaminas.
- 20 4. Método para preparar una disolución acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para el cultivo celular de células CHO derivadas de tejido de ovario de hámster chino.
- 25 5. Método para llevar a cabo la filtración de membrana de una disolución acuosa que presenta una filtrabilidad de membrana mejorada que comprende un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para células animales, y un agente quelante, en el que el método comprende añadir el agente quelante a la disolución acuosa antes del ajuste de pH final de la disolución acuosa, y en el que el agente quelante se añade a una concentración de 0.1 a 100 mmoles/l simultáneamente junto con el medio de cultivo en polvo
- 30 6. Método para llevar a cabo la filtración de membrana según la reivindicación 5, en el que el agente quelante es uno o más seleccionados de entre ácido cítrico, ácido málico, ácido etilendiaminotetraacético, sal sódica hierro (III) de ácido etilendiaminotetraacético, ácido siálico, y sales o hidratos de los mismos
- 35 7. Método para llevar a cabo la filtración de membrana según la reivindicación 5 o 6, en el que el medio de cultivo en polvo incluye además una o más seleccionadas de entre sales metálicas, azúcares y vitaminas
8. Método para llevar a cabo una filtración de membrana según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para el cultivo celular de células CHO derivadas de tejido de ovario de hámster chino
- 40 9. Método para llevar a cabo una filtración de membrana según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el filtro de membrana utilizado en la filtración de membrana presenta un tamaño de poro de 1 nm a 100 μm
- 45 10. Método para mejorar la filtrabilidad de membrana de una disolución acuosa, comprendiendo dicho método añadir un agente quelante y un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para células animales, a la disolución acuosa para preparar la disolución acuosa que incluye el medio de cultivo y el agente quelante, y llevar a cabo la filtración de membrana de la disolución acuosa, en el que se añade el agente quelante antes del ajuste de pH final de la disolución acuosa, y se añade a una concentración de 0.1 a 100 mmoles/l simultáneamente junto con el medio de cultivo en polvo.
- 50 11. Método para producir una sustancia fisiológicamente activa, comprendiendo dicho método añadir un agente quelante, antes del ajuste de pH final, a una disolución acuosa para preparar una disolución acuosa que incluye un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo para células animales, y el agente quelante y que presenta una filtrabilidad de membrana mejorada, llevar a cabo la filtración de membrana de la disolución acuosa, y cultivar a continuación las células utilizando la disolución acuosa resultante, en el que el agente quelante se añade a una concentración de 0.1 a 100 mmoles/l simultáneamente junto con el medio de cultivo en polvo.

FIG.1

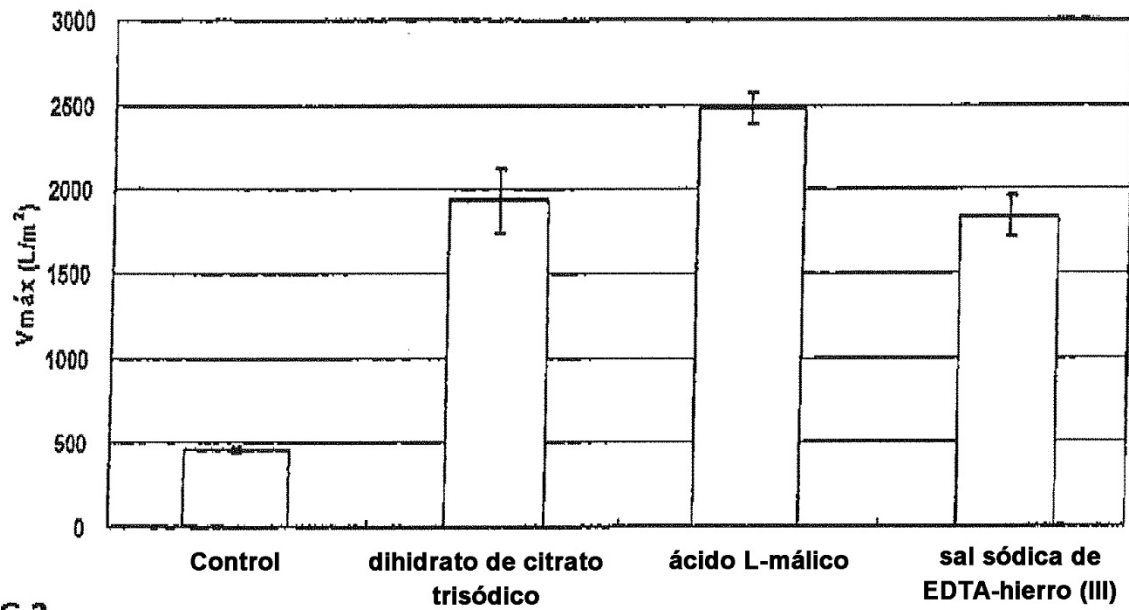


FIG.2

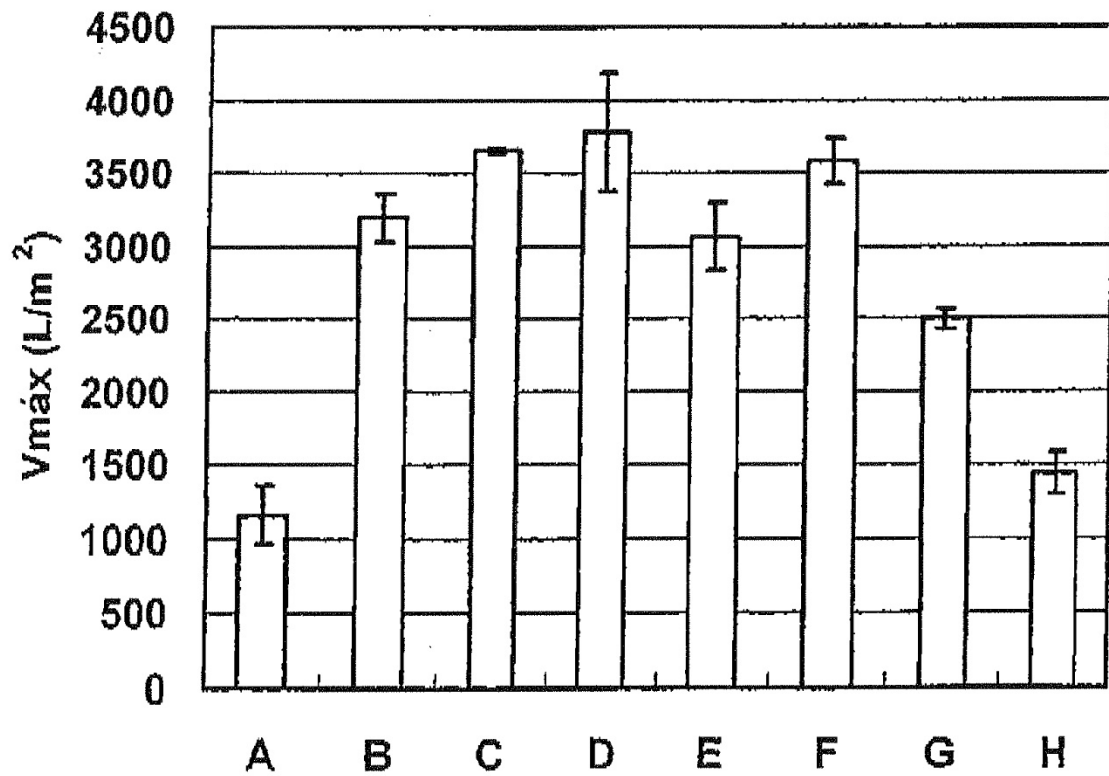


FIG.3

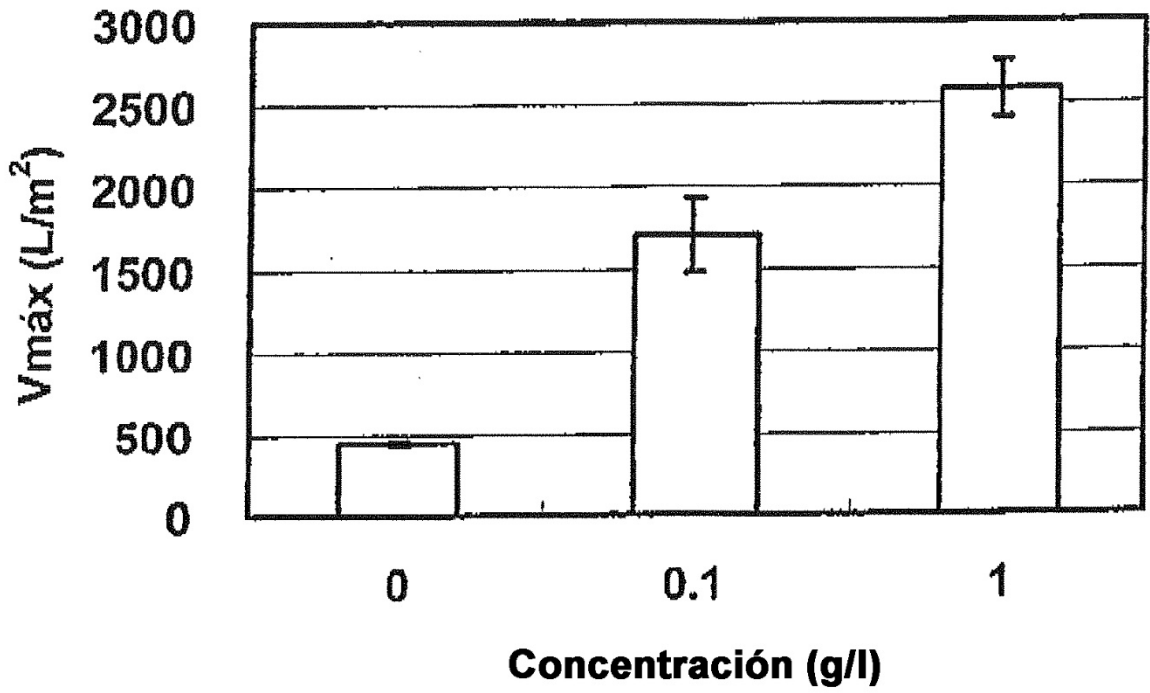


FIG.4

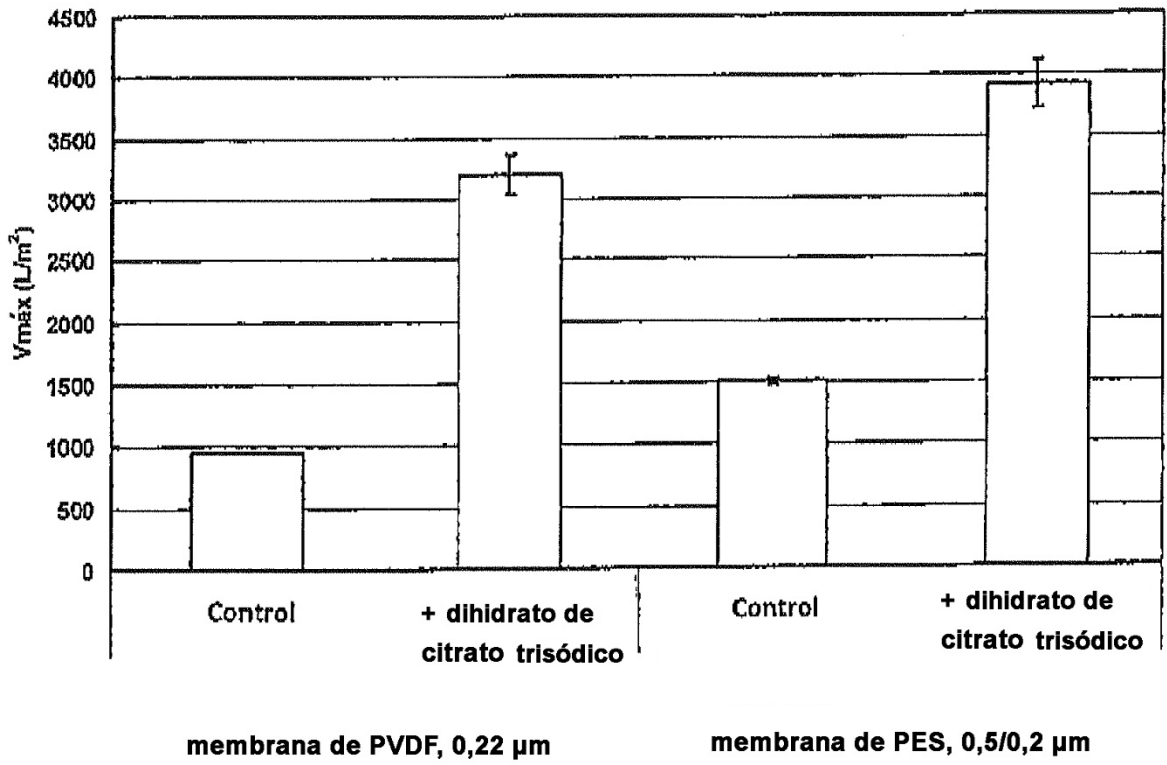


FIG.5

