

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037693-00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:51:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

PCT **B-T**
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA **INVENTARIO**

11-37693

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

TITULO: PRODUCTOS DE ALTOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS

SOLICITANTE: SCHERING CORPORATION

DIRECCIÓN: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 28 de marzo de 2011

P2011/000063

26-04-2011

ME

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037693-00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:51:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000063

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: SCHERING CORPORATION

Dirección: 2000 Galloping Hill Road,
Kenilworth, NJ 07033-0530

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estado Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747

TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: 1. Rajesh KRISHNA, 2. Dennis RENDEIRO, 3. Sandeepa
SANDADI

Dirección: 1. 12 Hidden Valley Road, Annandale, New Jersey 08801
E.U.A., 2. 46 The Glen, Cedar Grove, New Jersey 07009 E.U.A, 3. 2211
Woodbridge Commons Way, Iselin, New Jersey 08830 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: 1 y 2. Estadounidenses, 3. Hindú

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/058164 Fecha Septiembre 24, 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/036767 Fecha Abril 1, 2010

6

Título (54) PRODUCTOS DE ALTOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS

Clasificación Internacional (51) C12N 5/00, C07K 16/28

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 26, 2008

(31) Número de Solicitud

61/100.450

9

Comprobante de pago No. 11-0027441

Fecha Marzo de 2011

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 09-014.463

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos). Secuencias.

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso; documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

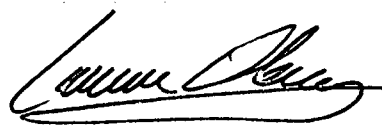
FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:


C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

3



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0027441

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 16:23:15

RECIBIDO DE : OLARTERAISBECK

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418332633	25/03/2011	6.026.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037693- -00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:51:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 16:23:16

A

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del
Ministerio de Justicia de Colombia

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SCHERING CORPORATION**

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento Público
2. ha sido firmado por Marguerite La Corte
3. Quien ejerce funciones de Notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de Marguerite La Corte Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 29 de agosto 2003
7. Por John E. McCormac Contador Publico- Tesorero de Nueva Jersey
8. No. A 180345
9. Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma legible de John M.

PODER DE REPRESENTACIÓN

Bilingüe inglés- español otorgado en Kenilworth, Nueva Jersey,
Estados Unidos, el 7 de agosto de 2003 y firmado por Edward H.
Mazer - Director Juridico senior.

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, fechado el 7 de agosto, 2003 certificando
las funciones de Edward H. Mazer - Director Juridico senior, de
Schering Corporation.

Las certificaciones anteriores se basan en el Poder de
representación fechado el 4 noviembre de 2002.

Sello: Marguerite La Corte- Notario público,
Estado de Nueva Jersey

Su comisión vence el 7 de octubre de 2003.

Sello en alto relieve del Notario Público

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo, para
confrontación. Bogotá 5 septiembre, 2003.

Marlene Neira
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

5

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARGUERITE LA CORTE
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARGUERITE LA CORTE, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 29TH DAY OF AUGUST 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A180345
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,
SCHERING CORPORATION

domiciled in
2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0532, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en
por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o Ana María Frieri

podr especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:


Edward H. Mazer, Senior Legal Director

Date/Fecha:

August 7, 2003

City/Country/Ciudad, País: Kenilworth, New Jersey, U.S.A.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date, **August 7, 2003**

The undersigned Notary Public certifies:

1. That **Edward H. Mazer**

of legal age and domiciled in

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Senior Legal Director of SCHERING CORPORATION**

3. That **SCHERING CORPORATION**

having its principal place of business located in

2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0530, U.S.A.

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Power of Attorney, dated November 4, 2002.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

de

4. Que

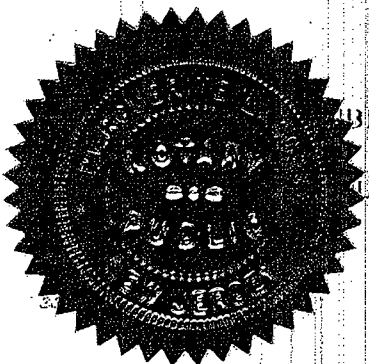
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

BLIC (Signature):



Marguerite La Corte
Marguerite La Corte
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires October 7, 2003

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 April 2010 (01.04.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/036767 A1

- (51) International Patent Classification:
C12N 5/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/058164
- (22) International Filing Date:
24 September 2009 (24.09.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/100,450 26 September 2008 (26.09.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
SCHERING CORPORATION [US/US]; 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): KRISHNAN, Rajesh [US/US]; 12 Hidden Valley Road, Annandale, New Jersey 08801 (US). RENDEIRO, Dennis [US/US]; 46 The Glen, Cedar Grove, New Jersey 07009 (US). SANDADI, Sandeepa [IN/US]; 2211 Woodbridge Commons Way, Iselin, New Jersey 08830 (US).
- (74) Agent: TRIOLO, Thomas, A.; Schering-Plough Corporation, 2000 Galloping Hill Road, Mailstop K-6-1 1990, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: HIGH TITER ANTIBODY PRODUCTION

(57) Abstract: The present invention provides, in part, methods for recombinantly expressing proteins at a high level along with cell culture media for doing the same.

WO 2010/036767 A1

High titer antibody production

This application claims the benefit of U.S. provisional patent application no.
5 61/100,450; filed September 26, 2008, which is herein incorporated by reference in its
entirety.

Field of the Invention

The present invention relates, generally, to a method for producing large quantities
10 of a protein, such as an antibody, in a cell culture; along with the cell culture itself.

Background of the Invention

Culturing cells for the commercial production of therapeutic proteins is a costly
process. The equipment required is expensive and research and development and
15 production costs are high. Development of cell culture processes which maximize the
quantity of therapeutic protein produced per liter of cell culture will minimize the resources
necessary to produce a given quantity of the protein. It is, thus, desirable to use
commercially viable processes which produce large quantities of proteins.

Many naturally occurring cells do not produce large quantities of desired proteins,
20 under standard culture conditions. Rather, extensive research and development of cell
culture processes, which coax cells in culture to generate large quantities of therapeutic
protein, must be performed. Typically, identifying the optimal cell culture conditions is
difficult and requires a significant amount of inventive input.

Summary of the Invention

The present invention provides, generally, methods and compositions for generating
high quantities of protein from cells in culture by use of various culture supplements and
other alterations to the culture conditions.

The present invention provides a method for producing a protein comprising
30 inoculating an initial mammalian cell growth medium with host cells expressing the protein
and adding supplements comprising those set forth below, optionally at the approximate
indicated concentrations (not including the quantity of each component from other sources
such as from the initial mammalian cell culture medium):

Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter

9

Biotin:	0.28 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Glycine	72 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
i-Inositol:	73.2 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-arginine	312.4 mg/liter
L-asparagine:	842 mg/liter
L-aspartic acid	97.6 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-glutamic acid	155.4 mg/liter
L-histidine	167 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
L-isoleucine	422 mg/liter
L-leucine	384 mg/liter
L-lysine	365 mg/liter
L-methionine	147.2 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
L-phenylalanine	207 mg/liter
L-proline	239 mg/liter
L-serine:	281 mg/liter
L-threonine	211.6 mg/liter
L-tryptophan	109.2 mg/liter
L-tyrosine	234 mg/liter
L-valine	308.8 mg/liter
Manganese chloride tetrahydrate:	0.0003 mg/liter

Niacin:	31.4 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Thiamine HCl:	16 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Tin chloride dehydrate:	0.00008 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Glucose	1.5 g/liter
L-glutamine	150 mg/liter

In an embodiment of the invention, some supplements are added from an amino acid feed stock solution (e.g., a 50X stock solution) that comprises amino acids at about the following concentrations:

L-arginine:	6.32 g/liter
L-cystine:	1.7 g/liter
L-histidine:	2.1 g/liter
L-isoleucine:	2.6 g/liter
L-leucine:	2.6 g/liter
L-lysine:	3.6 g/liter
L-Methionine:	0.76 g/liter
L-phenylalanine:	1.65 g/liter
L-threonine:	2.38 g/liter
L-tryptophan:	0.51 g/liter
L-tyrosine:	1.8 g/liter
L-valine:	2.34 g/liter

- 5 In an embodiment of the invention, about 20 ml amino acid feed stock solution is added per liter of culture. In an embodiment of the invention, the following supplements are added from an amino acid feed stock solution (e.g., a 100X stock solution) that comprises amino acids at about the following concentrations:

10

L-alanine:	0.89 g/liter
L-asparagine:	1.5 g/liter
L-aspartic acid:	1.33 g/liter
L-glutamic acid:	1.47 g/liter
Glycine:	0.75 g/liter
L-proline:	1.15 g/liter
L-serine:	1.05 g/liter

In an embodiment of the invention, the amino acid feed stock solution is added at about 10 ml amino acid feed is added per liter of culture. In an embodiment of the invention, some of the supplements are added from a nutrient feed stock solution (e.g., a 50X stock solution) that comprises supplements at about the following concentrations:

L-asparagine:	40.6 g/liter
L-proline	10.81 g/liter
L-isoleucine	18.53 g/liter
L-cysteine-HCl	11.19 g/liter
L-leucine	16.58 g/liter
L-threonine	8.2 g/liter
L-tyrosine	9.9 g/liter
L-arginine	9.29 g/liter
L-aspartic acid	3.56 g/liter
L-glutamic acid	6.28 g/liter
Glycine	2.83 g/liter
L-histidine	6.23 g/liter
L-methionine	6.58 g/liter
L-tryptophan	4.93 g/liter
L-lysine	14.66 g/liter
L-phenylalanine	8.64 g/liter
L-valine	13.08 g/liter
L-serine:	13 g/liter
Sodium phosphate monobasic:	14.41 g/liter
Zinc sulfate:	0.054 g/liter
Cupric sulfate:	0.00016 g/liter
Ammonium vanadate:	0.000039 g/liter
Cobalt chloride:	0.000125 g/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.00002 g/liter

Sodium molybdate dehydrate: 0.000008 g/liter

Tin chloride dehydrate: 0.000004 g/liter

Manganese chloride: tetrahydrate: 0.000015 g/liter

In an embodiment of the invention, about 20 ml of the nutrient feed stock solution is added per liter of culture. In an embodiment of the invention, some of the supplements are added from a vitamin/salt feed stock solution (e.g., a 50X stock solution) that comprises supplements at about the following concentrations:

Sodium selenite: 7.13×10^{-4} g/liter

Adenine sulfate: 0.0816 g/liter

Adenosine: 0.88 g/liter

Cytidine: 0.88 g/liter

Guanosine: 0.88 g/liter

Uridine: 0.88 g/liter

Hypoxanthine: 0.59 g/liter

L-citrulline: 0.63 g/liter

L-ornithine-HCl: 1.28 g/liter

Biotin: 0.014 g/liter

Flavin Adenine Dinucleotide: 0.0025 g/liter

Folic Acid: 0.23 g/liter

Lipoic Acid: 0.026 g/liter

Niacin: 1.57 g/liter

Pyridoxine HCl: 0.15 g/liter

Riboflavin: 0.093 g/liter

Thiamine HCl: 0.8 g/liter

Vitamin E: 0.0188 g/liter

Vitamin B12: 0.17 g/liter

Choline Chloride: 2.51 g/liter

Ethanolamine HCl: 0.22 g/liter

i-Inositol: 3.66 g/liter

Thymidine: 0.39 g/liter

Putrescine 2HCl: 0.02 g/liter

Progesterone: 0.00075 g/liter

D-Calcium Pantothenate: 1.19 g/liter

- 5 In an embodiment of the invention, about 20 ml vitamin/salt feed is added per liter of culture. In an embodiment of the invention, the method further comprises harvesting the culture medium from the cells; wherein said protein is secreted from said cells into the medium. For example, in an embodiment of the invention, the culture medium is harvested from the

cells when viability of the cells is below about 60%. The culture medium can be harvested from the cells, for example, by centrifuging the medium and/or depth filtering the medium and/or filtering the medium through a 0.2 micron filter. The protein expressed using the method of the invention, can be any protein, for example, an antibody or antigen-binding
5 fragment thereof, e.g., that binds specifically to IGF1R, e.g., wherein the antibody or fragment comprises a heavy immunoglobulin chain comprising the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3,-6, 13, 21 and 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom;
and a light immunoglobulin chain comprising an amino acid sequence selected from the
10 group consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom; for example, wherein the antibody or fragment is a full antibody that comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9, e.g., wherein the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant
15 immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1 constant immunoglobulin chain. In an embodiment of the invention, the initial mammalian cell growth medium to which the supplements are added comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids, recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or
20 animal-derived components.

The present invention includes within its scope a method for producing an antibody (e.g., monoclonal, recombinant and/or fully human) comprising inoculating an initial mammalian cell growth medium, pre-warmed to about 37°C; which medium comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids,
25 recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and which does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components; with CHO DXB11 host cells expressing the antibody light chain immunoglobulin and heavy chain immunoglobulin, to a cell density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml; and, adding the following supplements to the medium before, simultaneously with or immediately after said inoculation:
30 soy hydrolysate to a final concentration of about 10 g/liter;
and, optionally, amino acids to about the following final concentrations (not including the quantity of said amino acids from other sources such as the initial mammalian cell growth medium):

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter

L-isoleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
Glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; and, when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml, adding supplement feeds wherein the components from said supplement feeds (not including the quantity of each component from other feeds) reach an approximate final culture concentration set forth below:

Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter

12

Thiamine HCl:	16 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
i-Inositol:	73.2 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter
L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter
L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter

; and, during cell growth, adding glucose to the medium when glucose levels fall below about 1.5 g/liter and adding L-glutamine when L-glutamine levels fall below about 150

mg/liter; and during cell growth maintaining O₂ concentration at about 60%; pH at about 6.8 ± 0.02 and temperature at about 36.5°C ± 0.5°C. In an embodiment of the invention, the antibody comprises a heavy immunoglobulin chain comprising the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3,-6, 13, 21 and
5 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom;
and a light immunoglobulin chain comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom, e.g., wherein the antibody comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain
10 immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9. For example, in an embodiment of the invention, the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1 constant immunoglobulin chain. The method optionally further comprises recovering the culture
15 medium from the cells by disk-stack centrifuging the medium, depth filtering the medium and filtering the medium through a filter with a 0.2 micron pore size and, optionally, the further step of purifying the immunoglobulin chains from the medium by column chromatographic fractionation.

The present invention also provides an aqueous liquid cell culture medium comprising:
20 about 10 g/liter soy hydrolysate,
about 1.5 g/liter glucose,
about 150 mg/liter L-glutamine,
pH of about 6.8 ± 0.02,
HEPES,
25 Sodium bicarbonate buffers,
Inorganic salts,
Non-essential amino acids,
Recombinant human insulin,
Trace elements,
30 Surfactants,
an amino acid feed wherein the concentration of the components added by said amino acid feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter
L-isoleucine:	52 mg/liter

B

L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
Glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; wherein the medium does not comprise antibiotics, antimycotics or animal-derived components. Moreover the present invention provides a cell culture in which a cell expressing a immunoglobulins of interest have been grown.

For example, the present invention provides a liquid culture medium produced by a process comprising inoculating an initial mammalian cell growth medium, pre-warmed to about 37°C; which medium comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids, recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and which does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components; with CHO DXB11 host cells expressing the antibody light chain immunoglobulin and heavy chain immunoglobulin, to a cell density of about 2.5-5 X 10⁵ cells/ml; and, adding the following supplements to the medium before, simultaneously with or immediately after said inoculation:
soy hydrolysate to a final concentration of about 10 g/liter;
and, optionally, an amino acid feed wherein the concentration of the components added by said amino acid feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter
L-isoleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter

L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
Glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; and, when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml, adding supplement feeds wherein the concentration of the components added by said supplement feeds are approximately those set forth below:

Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter
Thiamine HCl:	16 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter

14

Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
i-Inositol:	73.2 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter
L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter
L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter

; and, during cell growth, adding glucose to the medium when glucose levels fall below about 1.5 g/liter and adding L-glutamine when L-glutamine levels fall below about 150 mg/liter; and during cell growth maintaining O₂ concentration at about 60%; pH at about 6.8 ± 0.02 and temperature at about 36.5°C ± 0.5°C; wherein cell viability is about 60% or lower. In an embodiment of the invention, the culture medium includes host cells which

5 comprise a vector encoding an antibody or antigen-binding fragment thereof; optionally,

wherein host cell secreted antibody or fragment is in the medium. For example, in an embodiment of the invention, the immunoglobulins form an antibody or antigen-binding fragment thereof that binds specifically to IGF1R, e.g., wherein the antibody or fragment comprises a heavy immunoglobulin chain comprising the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, -6, 13, 21 and 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom; and/or a light immunoglobulin chain comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom, e.g., wherein the antibody or fragment comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9. In an embodiment of the invention, the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1 constant immunoglobulin chain. For example, wherein the host cells comprise a vector encoding immunoglobulins of an antibody or antigen-binding fragment thereof wherein the antibody or fragment is secreted into the medium. In an embodiment of the invention, the host cell viability is about 60% or lower and/or wherein cell growth has proceeded for about 14-24 days (e.g., about 14 days, about 15 days, about 16 days, about 17 days, about 18 days, about 19 days, about 20 days, about 21 days, about 22 days, about 23 days or about 24 days), e.g., by centrifuging the medium and cells and removing the cells from the medium, e.g., wherein the medium is also depth filtered and/or filtered through a 0.2 micron filter, for example, after centrifugation. Any medium comprising the characteristics of the medium generated as set forth above forms part of the present invention regardless of the process by which the medium was actually generated.

The present invention also provides a vessel (e.g., flask, a bioreactor, a tank bioreactor, a bag bioreactor or a disposable bioreactor, stirred tank bioreactor, a bubble column bioreactor, an air lift bioreactor, a fluidized bed bioreactor, or a packed bed bioreactor) comprising any culture medium of the invention.

Detailed Description of the Invention

The present application includes processes for antibody production (e.g., anti-IGF1R) from mammalian cells such as CHO (Chinese Hamster Ovary) cells. The processes are run in a variety of bioreactor culture systems, including stirred tank bioreactors, bag and disposable bioreactors, and shake flasks. The "level 3" production process yields, on average, a titer of about 1.2 g/L of antibody and a culture specific productivity of about 22 pg/cell/day. The "enhanced" process yields, on average, a titer of about 2.3 g/L antibody, with a specific productivity of about 30 pg/cell/day. Both processes involve the addition of

specific supplements to the production bioreactor culture either prior to inoculation or as in-process feeds to increase culture specific productivity, titer, biomass, and culture viability. For the level 3 process, three supplements are added-wheat and/or soy hydrolysates (hydrolysate feeds) are added (e.g., as 200 g/L (aq) solutions) to increase culture specific productivity. Either both hydrolysates or the soy hydrolysate feed by itself are typically added to the culture. Two concentrated feed solutions of amino acids (amino acid feeds) are added to elevate culture biomass and increase process titer. A concentrated vitamin and salt solution (vitamin/salt feed) is added to stabilize culture viability and increase biomass. The vitamin feed solution includes, for example, biotin, progesterone, inositol, nucleic acids, citrulline, hypoxanthine, lipoic acid, riboflavin, thiamine, choline, ethanolamine, folic acid, flavin, and vitamin B12.

For the enhanced process, the feed solutions are added, along with an additional concentrated nutrient solution (nutrient feed). The "nutrient feed" includes, for example, amino acids, zinc sulfate, cupric sulfate, ammonium vanadate, cobalt chloride, nickel dichloride, tin chloride, and manganese chloride. It can be added prior to inoculation or as an in-process feed to improve process titer and increase viability.

In addition, an in-process osmolality shift (to 400-500 mOsm) is optionally employed by addition of a concentrated salt solution, soy hydrolysate solution or carbon dioxide and sodium hydroxide (as part of the pH control for the bioreactor). The osmolality shift is employed in order to increase culture specific productivity and improve harvest viability. Furthermore, an in-process temperature downshift, from about 36°C to 37°C to 33-35°C, is optionally used to stabilize culture viability at the high viable cell counts.

For the purposes of the present invention, the term "in-process" refers to an event occurring during growth of a production cell culture following an initial cell inoculation (e.g., of cells expanded, for example, for a master cell bank or working cell bank).

A "production cell culture" refers to the cell culture from which a final product, such as an antibody (e.g., anti-IGF1R antibody) is to be isolated.

An "expansion cell culture" refers to cells or a culture of cells to be used for initial inoculation of a production cell culture.

An "nX" stock solution of supplements (wherein n is a number, such as 50), indicates that the stock solution is diluted by 1/n when added to the culture. For example, a 50X stock solution is normally diluted 1/50 when added to a culture.

Feeds

The processes of the present invention include steps wherein various feeds are added to an initial mammalian cell growth medium. These feeds include hydrolysate feed, vitamin/salt feed, amino acid feed and nutrient feed. Depending on the type of cell culture

process being used, the level 3 process or the enhanced process, the feeds may be added at different points.

The "initial mammalian cell growth medium" can be any of several types of aqueous mediums known in the art; and the meaning of this term would be readily known by any practitioner of ordinary skill in the art. Examples include EX-CELL ACF CHO medium (Sigma-Aldrich (St.Louis, MO); discussed further below), DMEM, DMEM/F-12, F-10 Nutrient Mixture, RPMI Medium 1640, F-12 Nutrient Mixture, Medium 199, Eagle's MEM, RPMI, 293 media, and Iscove's Media. For example, Eagle's minimal essential medium (MEM) comprises L-Arginine hydrochloride (126 mg/l), L-Cystine 2HCl (31 mg/l), L-Histidine hydrochloride-H₂O (42 mg/l), L-Isoleucine (52 mg/l), L-Leucine (52 mg/l), L-Lysine hydrochloride (73 mg/l), L-Methionine (15 mg/l), L-Phenylalanine (32 mg/l), L-Threonine (48 mg/l), L-Tryptophan (10 mg/l), L-Tyrosine disodium salt dehydrate (52 mg/l), L-Valine (46 mg/l), Choline chloride (1 mg/l), D-Calcium pantothenate (1 mg/l), Folic Acid (1 mg/l), Niacinamide (1 mg/l), Pyridoxal hydrochloride (1 mg/l), Riboflavin (0.1 mg/l), Thiamine hydrochloride (1 mg/l), i-Inositol (2 mg/l), Calcium Chloride (CaCl₂) (anhyd.) (200 mg/l), Magnesium Sulfate (MgSO₄) (anhyd.) (97.67 mg/l), Potassium Chloride (KCl) (400 mg/l), Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) (2200 mg/l), Sodium Chloride (NaCl) (6800 mg/l), Sodium Phosphate monobasic (NaH₂PO₄-H₂O) (140 mg/l), D-Glucose (Dextrose) (1000 mg/l) and Phenol Red (10 mg/l).

Modified Eagle Medium (MEM) (2X) comprises L-Arginine hydrochloride (504 mg/l), L-Cystine (96 mg/l), L-Glutamine (870 mg/l), L-Histidine hydrochloride-H₂O (168 mg/l), L-Isoleucine (208 mg/l), L-Leucine (208 mg/l), L-Lysine hydrochloride (290 mg/l), L-Methionine (60 mg/l), L-Phenylalanine (128 mg/l), L-Threonine (192 mg/l), L-Tryptophan (40 mg/l), L-Tyrosine disodium salt dehydrate (208 mg/l), L-Valine (155 mg/l), Choline chloride (4 mg/l), D-Calcium pantothenate (4 mg/l), Folic Acid (4 mg/l), Niacinamide (4 mg/l), Pyridoxal hydrochloride (4 mg/l), Riboflavin (0.4 mg/l), Thiamine hydrochloride (4 mg/l), i-Inositol (8 mg/l), Calcium Chloride (CaCl₂) (anhyd.) (285 mg/l), Ferric Nitrate (Fe(NO₃)₃·9H₂O) (1 mg/l), Magnesium Sulfate (MgSO₄) (anhyd.) (195 mg/l), Potassium Chloride (KCl) (800 mg/l), Sodium Bicarbonate (NaHCO₃) (8400 mg/l), Sodium Chloride (NaCl) (12800 mg/l), Sodium Phosphate monobasic (NaH₂PO₄-H₂O) (250 mg/l) and D-Glucose (Dextrose) (9000 mg/l).

RPMI Medium 1640 (1X) comprises Glycine (10 mg/l), L-Arginine (200 mg/l), L-Asparagine (50 mg/l), L-Aspartic acid (20 mg/l), L-Cystine 2HCl (65 mg/l), L-Glutamic Acid (20 mg/l), L-Glutamine (300 mg/l), L-Histidine (15 mg/l), L-Hydroxyproline (20 mg/l), L-Isoleucine (50 mg/l), L-Leucine (50 mg/l), L-Lysine hydrochloride (40 mg/l), L-Methionine (15 mg/l), L-Phenylalanine (15 mg/l), L-Proline (20 mg/l), L-Serine (30 mg/l), L-Threonine (20 mg/l), L-Tryptophan (5 mg/l), L-Tyrosine disodium salt dehydrate (29 mg/l), L-Valine

(20), Biotin (0.2 mg/l), Choline chloride (3 mg/l), D-Calcium pantothenate (0.25 mg/l), Folic Acid (1 mg/l), Niacinamide (1 mg/l), Para-Aminobenzoic Acid (1 mg/l), Pyridoxine hydrochloride (1 mg/l), Riboflavin (0.2 mg/l), Thiamine hydrochloride (1 mg/l), Vitamin B12 (0.005 mg/l), i-Inositol (35 mg/l), Calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (100 mg/l), Magnesium Sulfate (MgSO_4) (anhyd.) (48.84 mg/l), Potassium Chloride (KCl) (400 mg/l), Sodium Bicarbonate (NaHCO_3) (2000 mg/l), Sodium Chloride (NaCl) (6000 mg/l), Sodium Phosphate dibasic (Na_2HPO_4) anhydrous (800 mg/l), D-Glucose (Dextrose) (2000 mg/l) and Glutathione (reduced) (1 mg/l).

Generally, for the purposes of the present invention a "hydrolysate feed" includes wheat and/or soy hydrolysates. Generally, a soy or wheat hydrolysate is the product of an enzymatic digest of soy or wheat and can be purchased commercially. Typically, the hydrolysate is in cell culture grade water and is sterile. In an embodiment of the invention, the hydrolysate is a stock solution at 200 g/liter. In an embodiment of the invention, the hydrolysate is added to the culture medium to reach a final concentration of about 10 g/liter. In an embodiment of the invention, when using either the level 3 process or the enhanced process, the hydrolysate is added to the culture medium either initially, before, with or immediately after inoculation or at about 3 days after inoculation or when viable cell density reaches over about 1×10^6 cells/ml.

"Viable cell density" refers to the concentration of cells in the medium being analyzed (e.g., cells/ml) which are viable, e.g., capable of growth and replication (e.g., when used to inoculate a liquid culture or a solid culture medium) or capable of excluding a dye such as tryptan blue, eosin or propidium in a dye exclusion assay. Such assays are commonly known in the art.

Generally, for the purposes of the present invention, a "vitamin/salt feed" includes:

Sodium selenite	e.g., at a concentration of about 7.13×10^{-4} g/liter
Adenine sulfate	e.g., at a concentration of about 0.0816 g/liter
Adenosine	e.g., at a concentration of about 0.88 g/liter
Cytidine	e.g., at a concentration of about 0.88 g/liter
Guanosine	e.g., at a concentration of about 0.88 g/liter
Uridine	e.g., at a concentration of about 0.88 g/liter
Hypoxanthine	e.g., at a concentration of about 0.59 g/liter
L-citrulline	e.g., at a concentration of about 0.63 g/liter
L-ornithine-HCl	e.g., at a concentration of about 1.28 g/liter
Biotin	e.g., at a concentration of about 0.014 g/liter
Flavin Adenine Dinucleotide	e.g., at a concentration of about 0.0025 g/liter
Folic Acid	e.g., at a concentration of about 0.23 g/liter
Lipoic Acid	e.g., at a concentration of about 0.026 g/liter
Niacin	e.g., at a concentration of about 1.57 g/liter
Pyridoxine HCl	e.g., at a concentration of about 0.15 g/liter
Riboflavin	e.g., at a concentration of about 0.093 g/liter
Thiamine HCl	e.g., at a concentration of about 0.8 g/liter
Vitamin E	e.g., at a concentration of about 0.0188 g/liter
Vitamin B12	e.g., at a concentration of about 0.17 g/liter

Choline Chloride	e.g., at a concentration of about 2.51 g/liter
Ethanolamine HCl	e.g., at a concentration of about 0.22 g/liter
i-Inositol	e.g., at a concentration of about 3.66 g/liter
Thymidine	e.g., at a concentration of about 0.39 g/liter
Putrescine 2HCl	e.g., at a concentration of about 0.02 g/liter
Progesterone	e.g., at a concentration of about 0.00075 g/liter; and
D-Calcium Pantothenate	e.g., at a concentration of about 1.19 g/liter

In an embodiment of the invention, the vitamin/salt feed is a 50X stock solution. In an embodiment of the invention, the vitamin/salt feed is added to the culture medium to reach a final concentration of about 20 ml/liter. When employing the level 3 process, the vitamin/salt feed is added to the culture between days 3 and 5, post-inoculation, or when
5 viable cell density reaches over about 1×10^6 cells/ml. In an embodiment of the invention, when employing the enhanced process, the vitamin/salt feed is added to the culture between days 3 and 5, post-inoculation, or when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml.

Generally, for the purposes of the present invention, an "amino acid feed" includes:

L-arginine	e.g., at a concentration of about 6.32 g/liter
L-cystine	e.g., at a concentration of about 1.7 g/liter
L-histidine	e.g., at a concentration of about 2.1 g/liter
L-isoleucine	e.g., at a concentration of about 2.6 g/liter
L-leucine	e.g., at a concentration of about 2.6 g/liter
L-lysine	e.g., at a concentration of about 3.6 g/liter
L-Methionine	e.g., at a concentration of about 0.76 g/liter
L-phenylalanine	e.g., at a concentration of about 1.65 g/liter
L-threonine	e.g., at a concentration of about 2.38 g/liter
L-tryptophan	e.g., at a concentration of about 0.51 g/liter
L-tyrosine	e.g., at a concentration of about 1.8 g/liter
L-valine	e.g., at a concentration of about 2.34 g/liter
L-alanine	e.g., at a concentration of about 0.89 g/liter
L-asparagine	e.g., at a concentration of about 1.5 g/liter
L-aspartic acid	e.g., at a concentration of about 1.33 g/liter
L-glutamic acid	e.g., at a concentration of about 1.47 g/liter
Glycine	e.g., at a concentration of about 0.75 g/liter
L-proline	e.g., at a concentration of about 1.15 g/liter; and
L-serine	e.g., at a concentration of about 1.05 g/liter

10

In an embodiment of the invention, two separate amino acid feed stock solutions are prepared: a 100X stock solution including L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycine, L-proline and L-serine at the concentrations set forth above; and
15 and a 50X solution including L-arginine, L-cystine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-Methionine, L-phenylalanine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine, and L-valine at the concentrations set forth above. These stocks can be made and added separately to the culture medium. In an embodiment of the invention, the amino acid stock solution is added to the initial medium at day 0, before, with or immediately after cell inoculation.

Generally, for the purposes of the present invention, a "nutrient feed" includes:

L-asparagine:	e.g., at a concentration of about 40.6 g/liter
L-proline	e.g., at a concentration of about 10.81
L-isoleucine	e.g., at a concentration of about 18.53
L-cysteine-HCl	e.g., at a concentration of about 11.19
L-leucine	e.g., at a concentration of about 16.58
L-threonine	e.g., at a concentration of about 8.2
L-tyrosine	e.g., at a concentration of about 9.9
L-arginine	e.g., at a concentration of about 9.29
L-aspartic acid	e.g., at a concentration of about 3.56
L-glutamic acid	e.g., at a concentration of about 6.28
Glycine	e.g., at a concentration of about 2.83
L-histidine	e.g., at a concentration of about 6.23
L-methionine	e.g., at a concentration of about 6.58
L-tryptophan	e.g., at a concentration of about 4.93
L-lysine	e.g., at a concentration of about 14.66
L-phenylalanine	e.g., at a concentration of about 8.64
L-valine	e.g., at a concentration of about 13.08 g/liter
L-serine:	e.g., at a concentration of about 13 g/liter
Sodium phosphate monobasic:	e.g., at a concentration of about 14.41 g/liter
Zinc sulfate:	e.g., at a concentration of about 0.054 g/liter
Cupric sulfate:	e.g., at a concentration of about 0.00016 g/liter
Ammonium vanadate:	e.g., at a concentration of about 0.000039 g/liter
Cobalt chloride:	e.g., at a concentration of about 0.000125 g/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	e.g., at a concentration of about 0.00002 g/liter
Sodium molybdate dehydrate:	e.g., at a concentration of about 0.000008 g/liter
Tin chloride dehydrate:	e.g., at a concentration of about 0.000004 g/liter
Manganese chloride: tetrahydrate:	e.g., at a concentration of about 0.000015 g/liter

In an embodiment of the invention, the nutrient feed is a 50X stock solution. In an embodiment of the invention, the nutrient feed is added to the culture medium to reach a final concentration of about 20 ml/liter. When employing the enhanced process, the nutrient feed is added to the culture between days 3 and 5, post-inoculation, or when viable cell density reaches about 1.2×10^5 cells/ml.

Furthermore, in an embodiment of the invention, when employing either the level 3 or enhanced process, glucose (from a 2.5 M stock solution) and L-glutamine (from a 0.2 M stock solution) are added to the culture medium at any point, e.g., when the concentration of the nutrients fall below 1.5 g/liter glucose and 150 mg/liter L-glutamine.

Osmolality and temperature shift

The present invention also includes processes wherein the osmolality and/or the temperature of the culture is optionally shifted. The osmolality or temperature shift may be done at any point in-process.

The osmolality shift has been shown to increase culture specific productivity as well as cell viability. Typically, the initial mammalian cell growth medium has a starting osmolality of about 300 mOsm. The "osmolality shift" of the present invention, however, includes shifting the culture osmolality to from about 400 mOsm to about 500 mOsm.

Osmolality is a measure of the osmoles of solute per kilogram of solvent. Osmolality can be measured using an osmometer which measures colligative properties, such as freezing-point depression, vapor pressure, or boiling-point elevation.

Osmolality of a cell culture may be shifted by any of several means. For example, a
5 concentrated salt solution (e.g., including 5M NaCl salts stock, 8-12 mL/L added), soy hydrolysate solution (200 g/L stock, 50-80 mL/L added), or carbon dioxide may be added. In an embodiment of the invention, adding the nutrient feed to the medium shifts the osmolality.

In an embodiment of the invention, the temperature of the culture is optionally
10 shifted, e.g., in a step change, from about 36.5°C (+ 0.5°C) to between about 33°C and 35°C.

Proteins

The present invention includes embodiments comprising methods for
15 recombinantly producing proteins such as immunoglobulin chains. In an embodiment of the invention, the immunoglobulin comprises an anti-IGF1R antibody (e.g., human antibody, humanized antibody, chimeric antibody) or antigen-binding fragment thereof, e.g., including an immunoglobulin light and/or heavy chain variable region, optionally linked with an immunoglobulin constant region.

For example, the present invention includes methods wherein a protein to be
20 expressed (e.g., an anti-IGF1R antibody light chain or heavy chain immunoglobulin) is encoded by a polynucleotide in a plasmid vector, e.g., wherein the polynucleotide is operably linked to a promoter such as a CMV promoter. In an embodiment of the invention, the light and heavy chains are included in a single plasmid vector.

In an embodiment of the invention, the immunoglobulin chain encodes any of
25 those set forth below; for example, any of the following immunoglobulin light and/or heavy chains and/or any of the CDRs thereof (e.g., all 3 from a single light or heavy chain). Dotted, underscored type encodes the signal peptide. Solid underscored type encodes the CDRs. Plain type encodes the framework regions. In an embodiment of the invention, the
30 chains are expressed with the signal peptide which is cleaved upon secretion from the host cell to generate a mature fragment of the chain.

Compositions and processes for producing any of the following target immunoglobulin amino acid sequences or mature fragments thereof form part of the present invention.

35 19D12/15H12 Light Chain (SEQ ID NO: 1)

MSPSQLIGFLLLLWVPASRGEIVLTQVPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD
QSPKLLIKYASQSLSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSRLPHTFGGG

TKVEIKRT

19D12/15H12 Heavy Chain (SEQ ID NO: 2)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSSFAMHWVRQAP
5 GKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARLGNF
YYGMDVWGQGTTVTVSS

19D12/15H12 Light Chain-C (LCC) (SEQ ID NO: 3)

10 M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
15 G E R V T I T C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
20 S G T D F T L T I S S L E A E D A
A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 Light Chain-D (LCD) (SEQ ID NO: 4)

30 M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
G E R V T I T C R A S Q S I G S S
35 L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
S G T D F T L T I S S L E A E D F
40 A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 Light Chain-E (LCE) (SEQ ID NO: 5)

45 M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P G T L S V S P
50 G E R A T L S C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
55 S G T D F T L T I S R L E P E D A

5 A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
 G T K V E I K R T

19D12/15H12 Light Chain-F (LCF) (SEQ ID NO: 6)

10 M S P S Q L I G F L L L W V P A S
 R G E I V L T Q S P G T L S V S P
 G E R A T L S C R A S Q S I G S S
15 L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
 Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
 S G T D F T L T I S R L E P E D F
20 A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
 G T K V E I K R T

19D12/15H12 heavy chain-A (HCA) (SEQ ID NO: 7)

25 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val
 Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
30 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
35 Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn
40 Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 Ser

19D12/15H12 heavy chain-B (HCB) (SEQ ID NO: 8)

45 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val
 Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
50 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
55 Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn
60 Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 Ser

See international application publication no. WO2003/100008 which is incorporated herein by reference in its entirety.

2C6 heavy chain5 MELGLSWIFLLAILKGVQC

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFTFDDYAMH**WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSKGYVDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNLSRAEDTALYYCAK**DIRIGVAASYFFGMDV**WGHGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)

2C6 CDR-H1: **GFTFDDYAMH** (SEQ ID NO: 10)10 2C6 CDR-H2: **GISWNSGSKGYVDSVKG** (SEQ ID NO: 11)2C6 CDR-H3: **DIRIGVAASYFFGMDV** (SEQ ID NO: 12)**2C6 Light chain**MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC15 **AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSVLA**WYQQKPGKAPKLLIY**DASSLES**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYC**QQFN**SYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)2C6 CDR-L1: **RASQGISSVLA** (SEQ ID NO: 14)2C6 CDR-L2: **DASSLES** (SEQ ID NO: 15)20 2C6 CDR-L3: **QQFN**SYPT (SEQ ID NO: 16)**9H2 Heavy chain**MDWTWRILFLVAAATGAHS25 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMH**WVRQAPGQRLIEWMGWINAGNGNTKYS**QKFQ**GRVTITRDTSAS
TVYMESSLRSEDTAVYYCARG**GGMPVAGPGYFYYYGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)9H2 CDR-H1: **GYTFTSYVMH** (SEQ ID NO: 18)9H2 CDR-H2: **WINAGNGNTKYSQKFQ** (SEQ ID NO: 19)9H2 CDR-H3: **GGMPVAGPGYFYYYGMDV** (SEQ ID NO: 20)

30

9H2 Light chainMETPAQLLFLLLLWLPDTTG**EIVLTQSPGTL**SLSPGERATL**SCRASQSVRSYLA**WYQQKPGQAPRLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYCC**QQYGSSPWT**FGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 21)

35

9H2 CDR-L1: **RASQSVRSYLA** (SEQ ID NO: 22)9H2 CDR-L2: **GASSRAT** (SEQ ID NO: 23)

9H2 CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 24)

Heavy chain immunoglobulin variable region # 1.0 sequence

E VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CTASGFTFSS YAMNWRQAP GKGLEWVSAI SGSGGTTFYA
5 DSVKGRFTIS RDNSRTTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDLG WSDSYYYYYG MDVWGQGTTV
TVSS (SEQ ID NO: 25);

Light chain immunoglobulin variable region # 1.0 sequence

DIQMTQFP SSSLASVGDR VTITCRASQG IRNDLGWYQQ KPGKAPKRLI YAASRLHRGV
10 PSRFSGSGSG TEFTLTISL QPEDFATYYC LQHNSYPCSF GQGTKLEIKR (SEQ ID NO:
26);

Embodiments of the invention include those wherein the immunoglobulin is
expressed, for example, in combination of any of those set forth herein (e.g., heavy chain
Ig. # 1.0 and light chain Ig. #1.0; or LCC and HCA; or LCF and HCA; or LCC and HCB).

15 Pairing of the light and heavy chains can result in generation of an antibody or antigen-
binding fragment thereof.

In an embodiment of the invention, the light chain is fused to an immunoglobulin
constant chain, e.g., a kappa chain. In an embodiment of the invention, the heavy chain is
fused to an immunoglobulin constant chain, e.g., a gamma-1, gamma-2, gamma-3 or
20 gamma-4 chain.

Other proteins of interest that may be expressed using the methods and
compositions of the present invention include receptors, ligands, cytokines, chemokines,
growth factors, hormones and enzymes.

25 **Production process and materials**

Vectors, such as plasmids, including a gene to be expressed by a process of the
present invention may be introduced into a host cell by any of several methods known in the
art. Transformation can be carried out, e.g., by the calcium phosphate precipitation method
as described by Graham and Van der Eb, Virology, 52: 546 (1978). Other methods for
30 introducing DNA into cells such as by nuclear injection or by protoplast fusion may also be
used. Methods for transformation also include electroporation, liposomal transformation
and DEAE-Dextran transformation.

Host cells are, in an embodiment of the invention, mammalian cells. For example,
Chinese hamster ovary cells (CHO cells). A CHO-K1 cell is proline-requiring and is diploid
35 for the dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene. In an embodiment of the invention, the cell line

is the DXB11 CHO cell line (Urlaub *et al.* (1983) Cell 33: 405–412). Other cell lines include, for example, HEK293.

Host cells comprising a gene to be expressed using a process of the present invention may be selected and screened to identify the clone with the requisite characteristics for expression of a target gene. In Chinese hamster ovary (CHO) cells, one common approach, to achieve maximal expression, involves the use of mutant cell lines and a gradual increase in the selection pressure over several months for a co-transfected selection marker such as dihydrofolate reductase (DHFR) (Kaufman *et al.* (1982) J. Mol. Biol. 159: 601–621; Schimke *et al.* (1982) Natl. Cancer Inst. Monogr. 60: 79–86). In order to achieve high production rates, a dihydrofolate reductase (DHFR) negative cell line (e.g., a CHO cell line) (Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216–4220) is transformed with an expression vector containing a functional *DHFR* gene in combination with the target gene to be expressed. Amplification of the vector-inserted target genes occurs in response to addition of increasing amounts of the DHFR antagonist methotrexate (MTX) to the culture medium and clones or subpopulations carrying multiple copies of the recombinant genes are generated and can be selected (Wurm (1990) Biologicals 18:159–164). The gene amplification process typically takes several months until stable cell lines are obtained which show high target gene copy numbers and high production rates of the desired protein.

In an embodiment of the invention, a polynucleotide of the present invention is integrated into host cell (e.g., CHO, CHO-K1, CHO DXB11) chromosomal DNA or ectopic and autonomously replicating. In an embodiment of the invention, the polynucleotide of the present invention is present in the cell at several copies per cell (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20). Where an expression vector has been integrated into the genomic DNA of the host cell to improve stability, the copy number of the vector DNA, and, concomitantly, the amount of product which could be expressed, can be increased by selecting for cell lines in which the vector sequences have been amplified after integration into the DNA of the host cell. Integrated genes may be screened for the presence and relative amount of chromosomally incorporated DNA and corresponding mRNA and polypeptide synthesis by standard methods. For example, the presence of the desired integrate may be detected by standard procedures such as DNA sequencing, Southern blotting, Northern blotting and/or Western blotting.

Any of several cell culture mediums known in the art can be used to propagate cells expressing a target gene. Several commercially available culture mediums are available. If expressing a protein to be used therapeutically, animal-product-free media (e.g., serum-free media (SFM)) may be desirable. There are several methods known in the art by which cells may be adapted to growth in serum-free medium. For example, direct adaptation includes

merely switching cells from serum-supplemented media to serum-free media. Sequential adaptation or weaning includes switching cells from a serum-supplemented medium into a serum-free medium in several steps (e.g., 25% SFM, 50% SFM, 75% SFM, then, 90% SFM for about 3 passages, then 100% SFM). Sequential adaptation tends to be less harsh on
5 cells than direct adaptation. Generally, to adapt cells to serum-free media, the culture should be in mid-logarithmic phase, > 90% viable and seeded at a higher initial cell inoculum than during direct adaptation. In an embodiment of the invention, the initial mammalian cell growth medium is EX-CELL ACF CHO medium which is commercially available from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). This culture is animal-component free, with
10 HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), without L-glutamine, liquid, sterile-filtered and cell culture tested. The medium also includes inorganic salts, sodium bicarbonate buffers, essential and non-essential amino acids, vitamins, recombinant human insulin, plant hydrolysates, other organic compounds, trace elements, and surfactants. The medium also does not contain antibiotics, antimycotics or transferrin and also contains no
15 animal-derived proteins or other components. Typically, for reconstitution of the medium, a practitioner should aseptically add 20-40 ml of 200 mM L-glutamine solution per liter of medium prior to use.

A cell line containing a host cell comprising a gene to be expressed using a process of the present invention may also be stored in a master cell bank (MCB) and/or working cell
20 bank (WCB). Typically, when a cell line is to be used over many manufacturing cycles, a two-tiered cell banking system consisting of a master cell bank or master seed bank (MSB) and a working cell bank can be established. A cell line is established from a single host cell clone and this cell line is used to make-up the MCB. Generally, this MCB must be characterized and extensively tested for contaminants such as bacteria, fungi, viruses and
25 mycoplasma. A sample of cells from the MCB can be expanded to form the WCB, which is characterized for cell viability prior to use in a manufacturing process. The cells in a MCB or WCB can be stored in vials, for example, at low temperature (e.g., 0°C or lower, -20°C or -80°C).

Typically, the working cell bank includes cells from one vial of the master bank which
30 have been grown for several passages before storage. In general, when future cells are needed, they are taken from the working cell bank; whereas, the master cell bank is used only when necessary, ensuring a stock of cells with a low passage number to avoid genetic variation within the cell culture.

The present invention provides two processes for growing cells and recombinantly
35 producing a protein-the "level 3" process and the "enhanced process". Both processes generate high levels of proteins of interest, however the enhanced process generates especially high levels.

In an embodiment of the invention, the level 3 process for producing a protein, such as an antibody (e.g., anti-IGF1R) comprises the steps:

1-expanding cells expressing the protein in a standard initial mammalian growth media (e.g., Sigma CHO medium with added L-glutamine (4 mM)).

5 This expansion can be done, for example, in shake flasks. In an embodiment of the invention, expansion occurs by growth to about $1-2 \times 10^6$ cells/ml, dilution of a sample of those cells (e.g., to a density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml) and, then, re-growth to about $1-2 \times 10^6$ cells/ml, for about 10-30 passages.

10 2- inoculating an initial mammalian cell growth medium with the expanded cells from step (1), to a cell density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml, and adding supplements to the medium. The supplements are wheat and/or soy hydrolysate, amino acid feed, vitamin/salt feed, glucose and L-glutamine.

The day of inoculation is "day 0", the following day is "day 1", the following day is
15 "day 2", and so on.

Soy or wheat hydrolysates are added, for example, either on day 0 or after viable cell density has reached over about 10^6 cells/ml. In an embodiment of the invention, the hydrolysate(s) are simply added on day 3 when the viable cell density typically reaches 10^6 cells/ml.

20 Amino acid feeds (discussed above) are added, for example, at day 0, e.g., to reach approximate final culture concentrations as set forth below (not including the concentration of any indicated component from other sources such as from the initial mammalian cell growth medium):

<u>Component</u>	<u>Final concentration in culture (mg/liter)</u>
L-arginine	126.4
L-cystine	34
L-histidine	42
L-isoleucine	52
L-leucine	52
L-lysine	72
L-Methionine	15.2
L-phenylalanine	33
L-threonine	47.6
L-tryptophan	10.2
L-tyrosine	36
L-valine	46.8
L-alanine	8.9
L-asparagine	30
L-aspartic acid	26.6
L-glutamic acid	29.4
Glycine	15
L-proline	23
L-serine	21

In an embodiment of the invention, amino acid feeds are not added to the medium.

Vitamin/salt feed solution (discussed above) is added, for example, between days 3 and 5 or when viable cell density reaches about 10⁶ cells/ml, *e.g.*, to reach approximate final culture concentrations as set forth below (not including the concentration of any indicated component from other sources such as from the initial mammalian cell growth medium):

<u>Component</u>	<u>Final culture concentrations (mg/liter)</u>
Sodium selenite	0.01426
Adenine sulfate	1.632
Adenosine	17.6
Cytidine	17.6
Guanosine	17.6
Uridine	17.6
Hypoxanthine	11.8
L-citrulline	12.6
L-ornithine-HCl	25.6
Biotin	0.28
Flavin Adenine Dinucleotide	0.05
Folic Acid	4.6
Lipoic Acid	0.52
Niacin	31.4
Pyridoxine HCl	3
Riboflavin	1.86
Thiamine HCl	16
Vitamin E	0.376
Vitamin B12	3.4
Choline Chloride	50.2
Ethanolamine HCl	4.4
i-Inositol	73.2
Thymidine	7.8
Putrescine 2HCl	0.4
Progesterone	0.015
D-Calcium Pantothenate	23.8

Glucose is added, for example, when the glucose concentration in the culture medium falls below about 1.5 g/liter and L-glutamine is added, for example, when the glutamine concentration in the culture medium falls below about 150 mg/liter.

3- Optionally harvesting the cells from the production cell culture medium, *e.g.*, when viability is below 60%, by removing the cells from the culture medium (*e.g.*, by lowering the temperature of the cells to about 15°C, adding sodium-phosphate buffer to stabilize the pH at about 6.8 and centrifuging the culture medium to clarify it of cells). If the protein is secreted, the medium can be retained for further processing, if the protein is not secreted, the cells can be retained for further processing.

12

Any of several methods can be used to remove the cells from the medium, e.g., by centrifugation. For example, using a continuous disk-stack centrifuge, e.g., with a flow rate/sigma (cm/sec) of about 9.27×10^{-7} .

Furthermore, the medium can be filtered to remove cells, e.g., by depth filtration with or without a centrifuge. For example, with a centrifuge, the process can, in an embodiment of the invention, comprise use of an 8 ± 2 L broth/ft² filter (e.g., charged cellulose filter); without a centrifuge, the process can, in an embodiment of the invention, comprise use of a 20 ± 3 L broth/ft² filter.

In addition, the medium can be filtered through a fine filter, for example, with a 0.2 micron pore size (e.g., a PVDF filter).
and;

4- Optionally further purifying the protein, e.g., antibody, for example, chromatographically.

In an embodiment of the invention, the enhanced process for producing a protein, such as an antibody (e.g., anti-IGF1R) comprises the steps:

1-expanding cells expressing the protein in a standard initial mammalian growth media.

This expansion can be done, for example, in shake flasks. In an embodiment of the invention, expansion occurs by growth to about $1-2 \times 10^6$ cells/ml, dilution of a sample of those cells (e.g., to a density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml) and, then, regrowth to about $1-2 \times 10^6$ cells/ml, for about 10-30 cycles.

2- inoculating an initial mammalian cell growth medium with the expanded cells, to a cell density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml, and adding supplements to the medium. The supplements are soy and/or wheat hydrolysate, amino acid feed, vitamin/salt feed, nutrient feed, glucose and L-glutamine.

The day of inoculation is "day 0", the following day is "day 1", the following day is "day 2", and so on.

Soy and/or wheat hydrolysates are added, for example, either on day 0 or after viable cell density has reached over about 10^6 cells/ml. In an embodiment of the invention, the hydrolysate(s) are simply added on day 3.

Amino acid feeds (discussed above) are added, for example, at day 0, e.g., to reach approximate final culture concentrations as set forth below (not including the concentration of any indicated component from other sources such as from the initial mammalian cell growth medium):

<u>Component</u>	<u>Final concentration in culture (mg/liter)</u>
L-arginine	126.4

L-cystine	34
L-histidine	42
L-isoleucine	52
L-leucine	52
L-lysine	72
L-Methionine	15.2
L-phenylalanine	33
L-threonine	47.6
L-tryptophan	10.2
L-tyrosine	36
L-valine	46.8
L-alanine	8.9
L-asparagine	30
L-aspartic acid	26.6
L-glutamic acid	29.4
Glycine	15
L-proline	23
L-serine	21

In an embodiment of the invention, amino acid feeds are not added to the medium.

Vitamin/salt feed solution (discussed above) is added, for example, between days 3 and 5 or when viable cell density reaches about 1.2×10^6 cells/ml, e.g., to reach

- 5 approximate final culture concentrations set forth below (not including the concentration of any indicated component from other sources such as from the initial mammalian cell growth medium):

<u>Component</u>	<u>Final culture concentrations (mg/liter)</u>
Sodium selenite	0.01426
Adenine sulfate	1.632
Adenosine	17.6
Cytidine	17.6
Guanosine	17.6
Uridine	17.6
Hypoxanthine	11.8
L-citrulline	12.6
L-ornithine-HCl	25.6
Biotin	0.28
Flavin Adenine Dinucleotide	0.05
Folic Acid	4.6
Lipoic Acid	0.52
Niacin	31.4
Pyridoxine HCl	3
Riboflavin	1.86
Thiamine HCl	16
Vitamin E	0.376
Vitamin B12	3.4
Choline Chloride	50.2
Ethanolamine HCl	4.4
i-Inositol	73.2
Thymidine	7.8
Putrescine 2HCl	0.4
Progesterone	0.015

23

D-Calcium Pantothenate 23.8

Some components of the vitamin/salt feed are also in other feeds such as the amino acid feed. These final culture concentrations are of the components from the vitamin/salt feed and do not reflect the cumulative concentrations of the indicated components from both the amino acid feed and the vitamin/salt feed.

5 Nutrient feed (discussed above) is added, for example, between days 3 and 5 or when viable cell density reaches about 1.2×10^6 cells/ml, e.g., to reach approximate final culture concentrations set forth below (not including the concentration of any indicated component from other sources such as from the initial mammalian cell growth medium or amino acid feed):

<u>Component</u>	<u>Final culture concentration</u> <u>(mg/liter)</u>
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter
L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter
L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter
Tin chloride dehydrate:	0.00008 mg/liter
Manganese chloride tetrahydrate:	0.0003 mg/liter

10 Some components of the nutrient feed are also in other feeds such as the amino acid feed. These final culture concentrations are of the components from the nutrient feed and do not reflect the cumulative concentrations of the indicated components from both the amino acid feed and the nutrient feed.

15 Glucose is added, for example, when the glucose concentration in the culture medium falls below about 1.5 g/liter and L-glutamine is added, for example, when the glutamine concentration in the culture medium falls below about 150 mg/liter.

3- Optionally, harvesting the cells from the production cell culture medium, e.g., when viability is below 60%, by removing the cells from the culture medium (e.g., by lowering the temperature of the cells to about 15°C, adding sodium-phosphate buffer to stabilize the pH at about 6.8 and centrifuging the culture medium to clarify it of cells). If the protein is
5 secreted, the medium can be retained for further processing, if the protein is not secreted, the cells can be retained for further processing.

Any of several methods can be used to remove the cells from the medium, e.g., by centrifugation. For example, using a continuous disk-stack centrifuge, e.g., with a flow rate/sigma (cm/sec) of about 9.27×10^{-7} .

10 Furthermore, the medium can be filtered to remove cells, e.g., by depth filtration with or without a centrifuge. For example, with a centrifuge, the process can, in an embodiment of the invention, comprise use of an 8 ± 2 L broth/ft² filter (e.g., charged cellulose filter); without a centrifuge, the process can, in an embodiment of the invention, comprise use of a 20 ± 3 L broth/ft² filter.

15 In addition, the medium can be filtered through a fine filter, for example, with a 0.2 micron pore size (e.g., a PVDF filter).
and;

4- Optionally further purifying the protein, e.g., antibody, for example, chromatographically.

20 Optionally, when using either the level 3 or enhanced process, the osmolality of the culture is shifted to about 400 mOsm to about 500 mOsm (discussed above). In an embodiment of the invention, this shift occurs when the cells are at a density of at or above 1×10^6 cells/ml.

Optionally, when using either the level 3 or enhanced process, the temperature of
25 the culture is shifted to 33°C to about 35°C (discussed above). In an embodiment of the invention, this shift occurs, in an embodiment of the invention, between days 4 and 8, e.g., when the change in viable cell density over a 24 hour period is less than 10%.

In an embodiment of the invention, when using either the level 3 or enhanced process, the cell culture O₂ concentration, pH and temperature conditions are continuously
30 monitored and adjusted during cell growth. In an embodiment of the invention O₂ concentration is monitored and maintained at about 60% during cell growth; and/or pH is continuously monitored and maintained at about 6.8 (e.g., ± 0.02) during cell growth; and/or temperature is continuously monitored and maintained at about 36.5°C (e.g., about $\pm 0.5^\circ\text{C}$) during cell growth

35 Cell growth can be performed in any of several systems. For example, cell growth can be done in a simple flask, e.g., a glass shake flask. Other systems include tank bioreactors, bag bioreactors and disposable bioreactors. A tank bioreactor includes,

typically, a metal vessel (e.g., a stainless steel jacketed vessel) in which cells are growth in a liquid medium. Tank bioreactors can be used for a wide range of culture volumes (e.g., 100 l, 150 l, 10000 l, 15000 l). Tank bioreactors often have additional features for controlling cell growth conditions, including means for temperature control, medium agitation, controlling sparge gas concentrations, controlling pH, controlling O₂ concentration, removing samples from the medium, reactor weight indication and control, cleaning hardware, sterilizing the hardware, piping or tubing to deliver all services, adding media, control pH, control solutions, and control gases, pumping sterile fluids into the growth vessel and, supervisory control and a data acquisition. Classifications of tank bioreactor include stirred tank reactors wherein mechanical stirrers (e.g., impellers) are used to mix the reactor to distribute heat and materials (such as oxygen and substrates). Bubble column reactors are tall reactors which use air alone to mix the contents. Air lift reactors are similar to bubble column reactors, but differ by the fact that they contain a draft tube. The draft tube is typically an inner tube which improves circulation and oxygen transfer and equalizes shear forces in the reactor. In fluidized bed reactors, cells are "immobilized" on small particles which move with the fluid. The small particles create a large surface area for cells to stick to and enable a high rate of transfer of oxygen and nutrients to the cells. In packed bed reactors cells are immobilized on large particles. These particles do not move with the liquid. Packed bed reactors are simple to construct and operate but can suffer from blockages and from poor oxygen transfer. A disposable bioreactor is a disposable, one-time use bioreactor. Often, disposable bioreactors possess features similar to non-disposable bioreactors (e.g., agitation system, sparge, probes, ports, etc.).

The present invention further includes any liquid culture medium generated by any of the processes set forth herein; for example, produced by a process comprising inoculating an initial mammalian cell growth medium, pre-warmed to about 37°C; which medium comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids, recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and which does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components; with CHO DXB11 host cells expressing the antibody light chain immunoglobulin and heavy chain immunoglobulin, to a cell density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml; and, adding the following supplements to the medium before, simultaneously with or immediately after said inoculation:

soy hydrolysate to a final concentration of about 10 g/liter;

and, optionally, an amino acid feed wherein the concentration of the components added by said amino acid feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter

L-histidine:	42 mg/liter
L-isoleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; and, when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml, adding supplement feeds wherein the concentration of the components added by said supplement feeds are approximately those set forth below:

Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter

23

Thiamine HCl:	16 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
D-Inositol:	73.2 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter
L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter
L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter

; and, during cell growth, adding glucose to the medium when glucose levels fall below about 1.5 g/liter and adding L-glutamine when L-glutamine levels fall below about 150

mg/liter; and during cell growth maintaining O₂ concentration at about 60%; pH at about 6.8 ± 0.02 and temperature at about 36.5°C ± 0.5°C; for example, wherein the medium comprises cells that have reached 60% viability.

5

Examples

The following information is provided for more clearly describing the present invention and should not be construed to limit the present invention. Any and all of the compositions and methods described below, in whole or in part, fall within the scope of the present invention.

10

Example 1: Expression of anti-IGF1R using level 3 and enhanced process

Several runs using the enhanced process and the level 3 process were performed. In these runs, CHO DXB11 cells expressing the anti-IGF1R LCF (kappa) and HCA (gamma-1) chains were grown. The initial mammalian cell growth medium to which supplements were added was the EX-CELL ACF CHO medium (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO).

A similar set of runs were performed wherein there were no additions of feeds (except for in-process glutamine and glucose). Under these conditions, a titer of 435 mg/L was obtained. This titer was estimated by quantitating the immunoglobulin produced which adhered specifically to protein A. The titers obtained in the following level 3 and enhanced process runs were estimated from quantitating immunoglobulin that adhered to a reverse phase chromatography substrate. An estimated titer of about 300 mg/L would have been obtained in the run without addition of feeds had the reverse phase method of quantitation been used.

Relative to the titer obtained in the run excluding the addition of feeds, the level 3 and enhanced processes (discussed below) produce far superior titers.

Enhanced process

Cells were initially inoculated at 3 – 4 x 10⁵ cells/ml in the EX-CELL ACF CHO medium (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) which was pre-warmed to 37°C and adjusted to pH 6.8.

30 **Table 1. Feeds added for enhanced process runs.**

Batch	Feeds added	Time added	Volume ratio (volume feed/volume batch)	In-process temperature downshift
1	SHYS feed CHO feed1 CHO feed2	Day 0 Day 3 Day 3	0.05 0.02 0.02	Yes: day 6 from 37°C to 34°C

2	SHYS feed	Day 0	0.05	Yes: day 6 from 37°C to 34°C
	CHO feed1	Day 3	0.02	
	CHO feed2	Day 3	0.02	
3	HYS feed	Day 0	0.05	Yes: day 6 from 37°C to 34°C
	CHO feed1	Day 3	0.02	
	CHO feed2	Day 3	0.02	
4	HYS feed	Day 0	0.05	Yes: day 6 from 37°C to 34°C
	CHO feed1	Day 3	0.02	
	CHO feed2	Day 3	0.02	
5	SHYS feed	Day 0	0.05	No
	50X amino acid feed	Day 0	0.02	
	100X amino acid feed	Day 0	0.01	
	CHO feed1	Day 3	0.02	
	CHO feed2	Day 3	0.02	

SHYS feed: a 200 g/L (aq) soy hydrolysate feed from DMV international (Netherlands)

Hys feed: a 200 g/L (aq) soy hydrolysate feed from Kerry Biosciences

CHO feed 1: 50X Vitamin/salt feed

CHO feed 2: 50X Nutrient feed

5 50X amino acid feed

100X amino acid feed

pH was continuously monitored and adjusted to a setpoint of 6.8.

Oxygen concentration was continuously monitored and adjusted to a setpoint of 60%.

Temperature was continuously monitored and maintained at 37 ± 1°C An in-process

10 temperature downshift to 34°C was performed in the indicated batches.

Glucose was added, for example, when the glucose concentration in the culture medium fell below 1.5 g/liter and L-glutamine was added, for example, when the glutamine concentration in the culture medium fell below 150 mg/liter. The osmolality was shifted to over 400 mOsm from addition of the nutrient feed. The cells were harvested between days 21-24, except for batches 3 and 4 which were harvested earlier (days 14-18); generally, when cell viability was reduced to about 60%.

20 **Table 2. Results of enhanced process runs.**

Batch	Titer	Specific productivity
1	2.2	26
2	2.3	27
3*	1.9	30
4*	1.6	33
5	2.2	26

* Abbreviated batch run

25 The addition of amino acid feeds may be omitted when the nutrient feeds are used in the enhanced process.

Level 3 process

Cells were initially inoculated at 3 – 4 x 10⁵ cells/ml in the EX-CELL ACF CHO medium (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) which was pre-warmed to 37°C and adjusted to pH 6.8.

5

Table 3. Feeds added for level 3 process

Batch	Feeds added	Time added	Volume ratio (volume feed/volume batch)	In-process temperature downshift
A	SHYS feed	Day 0	0.05	No
	50X amino acid feed	Day 0	0.02	
	100X amino acid feed	Day 0	0.01	
	CHO feed1	Day 3	0.02	
B	SHYS feed	Day 0	0.05	No
	50X amino acid feed	Day 0	0.02	
	100X amino acid feed	Day 0	0.01	
	CHO feed1	Day 3	0.02	

SHYS feed: a 200 g/L (aq) soy hydrolysate feed from DMV international (Netherlands)
CHO feed1: 50X Vitamin/salt feed

50X amino acid feed

100X amino acid feed

pH was continuously monitored and maintained at 6.8 ± 0.02.

Oxygen concentration was continuously monitored and adjusted to a setpoint of 60%.

Temperature was continuously monitored and maintained at 36.5 ± 0.5°C.

Glucose was added, for example, when the glucose concentration in the culture medium fell below 1.5 g/liter and L-glutamine was added, for example, when the glutamine concentration in the culture medium fell below 150 mg/liter.

Table 4. Results of level 3 process runs.

Batch	Titer (g/L)	Specific productivity
A	1.4	19
B	1.2	22

The feeds used and the final concentrations of the components of each feed are set forth below.

Table 5. Vitamin/salt feed

Component	Concentration in feed (g/L)	Final concentration in culture (mg/L)
Sodium selenite	7.13 X 10 ⁻⁴	0.01426
Adenine sulfate	0.0816	1.632
Adenosine	0.88	17.6
Cytidine	0.88	17.6
Guanosine	0.88	17.6

Uridine	0.88	17.6
Hypoxanthine	0.59	11.8
L-citrulline	0.63	12.6
L-ornithine-HCl	1.28	25.6
Biotin	0.014	0.28
Flavin Adenine Dinucleotide	0.0025	0.05
Folic Acid	0.23	4.6
Lipoic Acid	0.026	0.52
Niacin	1.57	31.4
Pyridoxine HCl	0.15	3
Riboflavin	0.093	1.86
Thiamine HCl	0.8	16
Vitamin E	0.0188	0.376
Vitamin B12	0.17	3.4
Choline Chloride	2.51	50.2
Ethanolamine HCl	0.22	4.4
i-Inositol	3.66	73.2
Thymidine	0.39	7.8
Putrescine 2HCl	0.02	0.4
Progesterone	0.00075	0.015
D-Calcium Pantothenate	1.19	23.8

Table 6. Amino acid feed #1 (50X).

Component	Concentration in feed (g/L)	Final concentration in culture (mg/L)
L-arginine	6.32	126.4
L-cystine	1.7	34
L-histidine	2.1	42
L-isoleucine	2.6	52
L-leucine	2.6	52
L-lysine	3.6	72
L-Methionine	0.76	15.2
L-phenylalanine	1.65	33
L-threonine	2.38	47.6
L-tryptophan	0.51	10.2
L-tyrosine	1.8	36
L-valine	2.34	46.8

Table 7. Amino acid feed #2 (100X).

Component	Concentration in feed (g/L)	Final concentration in culture (mg/L)
L-alanine	0.89	8.9
L-asparagine	1.5	30
L-aspartic acid	1.33	26.6
L-glutamic acid	1.47	29.4
Glycine	0.75	15
L-proline	1.15	23
L-serine	1.05	21

Table 8. Nutrient feed.

Component	Concentration in feed (g/L)	Final concentration in culture (mg/L)
L-asparagine	40.6	812
L-serine	13	260
L-proline	10.81	216
L-isoleucine	18.53	370
L-cysteine-HCl	11.19	224
L-leucine	16.58	332
L-threonine	8.2	164
L-tyrosine	9.9	198
L-arginine	9.29	186
L-aspartic acid	3.56	71
L-glutamic acid	6.28	126
glycine	2.83	57
L-histidine	6.23	125
L-methionine	6.58	132
L-tryptophan	4.93	99
L-lysine	14.66	293
L-phenylalanine	8.64	174
L-valine	13.08	262
Sodium phosphate monobasic	14.41	288.2
Zinc sulfate	0.054	1.08
Cupric sulfate	0.00016	0.0032
Ammonium vanadate	0.000039	0.00078
Ccobalt chloride	0.000125	0.0025
Nickel dichloride hexahydrate	0.00002	0.0004
Sodium molybdate dihydrate	0.000008	0.00016
Tin chloride dihydrate	0.000004	0.00008
Manganese chloride tetrahydrate	0.000015	0.0003

5 The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, the scope of the present invention includes embodiments specifically set forth herein and other embodiments not specifically set forth herein; the embodiments specifically set forth herein are not necessarily intended to be exhaustive. Various modifications of the invention in addition to those described herein will become
10 apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the claims.

 Patents, patent applications, publications, product descriptions, and protocols are cited throughout this application, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties for all purposes.

We claim:

1. A method for producing a protein comprising inoculating an initial mammalian cell growth medium with host cells expressing the protein and adding supplements comprising:

- 5 Glucose;
L-glutamine;
Soy hydrolysate or wheat hydrolysate or both;
Adenine sulfate;
Adenosine;
ammonium vanadate;
Biotin;
Choline Chloride;
Cobalt chloride;
Cupric sulfate;
Cytidine;
D-Calcium Pantothenate;
Ethanolamine HCl;
Flavin Adenine Dinucleotide;
Folic Acid;
Glycine;
Guanosine;
Hypoxanthine;
i-Inositol;
L-alanine;
L-arginine;
L-asparagine;
L-aspartic acid;
L-citrulline;
L-cysteine-HCl;
L-cystine;
L-glutamic acid;
L-histidine;
Lipoic Acid;
L-isoleucine;
L-leucine;
L-lysine;

L-methionine;
L-ornithine-HCl;
L-phenylalanine;
L-proline;
L-serine;
L-threonine;
L-tryptophan;
L-tyrosine;
L-valine ;
Manganese chloride Tetrahydrate;
Niacin;
Nickel dichloride hexahydrate;
Progesterone;
Putrescine 2HCl;
Pyridoxine HCl;
Riboflavin;
Sodium molybdate dehydrate;
Sodium phosphate monobasic;
Sodium selenite;
Thiamine HCl;
Thymidine;
Tin chloride dehydrate;
Uridine;
Vitamin B12;
Vitamin E; and
Zinc sulfate;
to the medium.

2. The method of claim 1 wherein the final concentration of the components added to the medium from the supplements are about those set forth below:

Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter

29

Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Glycine	72 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
i-Inositol:	73.2 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-arginine	312.4 mg/liter
L-asparagine:	842 mg/liter
L-aspartic acid	97.6 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-glutamic acid	155.4 mg/liter
L-histidine	167 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
L-isoleucine	422 mg/liter
L-leucine	384 mg/liter
L-lysine	365 mg/liter
L-methionine	147.2 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
L-phenylalanine	207 mg/liter
L-proline	239 mg/liter
L-serine:	281 mg/liter
L-threonine	211.6 mg/liter
L-tryptophan	109.2 mg/liter
L-tyrosine	234 mg/liter
L-valine	308.8 mg/liter
Manganese chloride tetrahydrate:	0.0003 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter

Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Thiamine HCl:	16 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Tin chloride dehydrate:	0.00008 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Glucose	1.5 g/liter
L-glutamine	150 mg/liter

3. The method of claim 1 wherein the supplements are added from an amino acid feed that comprises amino acids at about the following concentrations:

L-arginine:	6.32 g/liter
L-cystine:	1.7 g/liter
L-histidine:	2.1 g/liter
L-isoleucine:	2.6 g/liter
L-leucine:	2.6 g/liter
L-lysine:	3.6 g/liter
L-Methionine:	0.76 g/liter
L-phenylalanine:	1.65 g/liter
L-threonine:	2.38 g/liter
L-tryptophan:	0.51 g/liter
L-tyrosine:	1.8 g/liter
L-valine:	2.34 g/liter

5 4. The method of claim 3 wherein about 20 ml amino acid feed is added per liter of culture medium.

5. The method of claim 1 wherein the supplements are added from an amino acid feed that comprises amino acids at about the following concentrations:

40

L-alanine:	0.89 g/liter
L-asparagine:	1.5 g/liter
L-aspartic acid:	1.33 g/liter
L-glutamic acid:	1.47 g/liter
Glycine:	0.75 g/liter
L-proline:	1.15 g/liter
L-serine:	1.05 g/liter

6. The method of claim 5 wherein about 10 ml amino acid feed is added per liter of culture medium.

- 5 7. The method of claim 1 wherein the supplements are added from a nutrient feed that comprises supplements at about the following concentrations:

L-asparagine:	40.6 g/liter
L-proline	10.81 g/liter
L-isoleucine	18.53 g/liter
L-cysteine-HCl	11.19 g/liter
L-leucine	16.58 g/liter
L-threonine	8.2 g/liter
L-tyrosine	9.9 g/liter
L-arginine	9.29 g/liter
L-aspartic acid	3.56 g/liter
L-glutamic acid	6.28 g/liter
Glycine	2.83 g/liter
L-histidine	6.23 g/liter
L-methionine	6.58 g/liter
L-tryptophan	4.93 g/liter
L-lysine	14.66 g/liter
L-phenylalanine	8.64 g/liter
L-valine	13.08 g/liter
L-serine:	13 g/liter
Sodium phosphate Monobasic:	14.41 g/liter
Zinc sulfate:	0.054 g/liter
Cupric sulfate:	0.00016 g/liter
Ammonium vanadate:	0.000039 g/liter

Cobalt chloride:	0.000125 g/liter
Nickel dichloride Hexahydrate:	0.00002 g/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.000008 g/liter
Tin chloride dehydrate:	0.000004 g/liter
Manganese chloride: tetrahydrate:	0.000015 g/liter.

8. The method of claim 7 wherein about 20 ml nutrient feed is added per liter of culture medium.

5 9. The method of claim 1 wherein the supplements are added from a vitamin/salt feed that comprises supplements at about the following concentrations:

Sodium selenite:	7.13×10^{-4} g/liter
Adenine sulfate:	0.0816 g/liter
Adenosine:	0.88 g/liter
Cytidine:	0.88 g/liter
Guanosine:	0.88 g/liter
Uridine:	0.88 g/liter
Hypoxanthine:	0.59 g/liter
L-citrulline:	0.63 g/liter
L-ornithine-HCl:	1.28 g/liter
Biotin:	0.014 g/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.0025 g/liter
Folic Acid:	0.23 g/liter
Lipoic Acid:	0.026 g/liter
Niacin:	1.57 g/liter
Pyridoxine HCl:	0.15 g/liter
Riboflavin:	0.093 g/liter
Thiamine HCl:	0.8 g/liter
Vitamin E:	0.0188 g/liter
Vitamin B12:	0.17 g/liter
Choline Chloride:	2.51 g/liter
Ethanolamine HCl:	0.22 g/liter
i-Inositol:	3.66 g/liter
Thymidine:	0.39 g/liter
Putrescine 2HCl:	0.02 g/liter
Progesterone:	0.00075 g/liter

D-Calcium Pantothenate: 1.19 g/liter

10. The method of claim 9 wherein about 20 ml vitamin/salt feed is added per liter of culture medium.

5 11. The method of claim 1 further comprising harvesting the medium from the host cells; wherein said protein is secreted from said cells into the medium.

12. The method of claim 13 wherein the culture medium is harvested from the host cells when viability of the cells is below about 60%.

10

13. The method of claim 11 further comprising purifying the culture medium from the cells by centrifuging the medium and/or depth filtering the medium and/or filtering the medium through a 0.2 micron filter.

15 14. The method of claim 1 wherein the protein is one or more immunoglobulin chains of an antibody or antigen-binding fragment thereof.

15. The method of claim 14 wherein the antibody or fragment binds specifically to IGF1R.

20 16. The method of claim 15 wherein the antibody or fragment comprises a heavy immunoglobulin chain comprising the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, -6, 13, 21 and 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom; and/or
a light immunoglobulin chain comprising an amino acid sequence selected from the group
25 consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom.

17. The method of claim 16 wherein the antibody or fragment secreted from the host cell is an antibody that comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of
30 SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9.

18. The method of claim 17 wherein the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1
35 constant immunoglobulin chain.

19. The method of claim 1 wherein the initial mammalian cell growth medium to which the supplements are added comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids, recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components.

5

20. A method for producing an antibody comprising inoculating an initial mammalian cell growth medium, pre-warmed to about 37°C; which initial medium comprises HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids, recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and which does not comprise L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components; with CHO DXB11 host cells expressing the antibody light chain immunoglobulin and heavy chain immunoglobulin, to a cell density of about $2.5-5 \times 10^5$ cells/ml; and, adding the following supplements to the medium before, simultaneously with or immediately after said inoculation:

10

soy hydrolysate to a final concentration of about 10 g/liter;

15

and, optionally, an amino acid feed wherein the concentration of the components added by said amino acid feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter
L-isoleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; and, when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml, adding supplement feeds wherein the concentration of the components added by said supplement feeds are approximately those set forth below:

Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter
Thiamine HCl:	16 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
D-Inositol:	73.2 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter
L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter

L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter

5 ; and, maintaining glucose concentration in the medium at about 1.5 g/liter and maintaining L-glutamine concentration in the medium at about 150 mg/liter; and during cell growth maintaining O₂ concentration at about 60%; pH at about 6.8 ± 0.02 and temperature at about 36.5°C ± 0.5°C; and, optionally, removing the host cells from the medium when cell viability is below about 60%.

10 21. The method of claim 20 wherein the antibody comprises a heavy immunoglobulin chain comprising the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3,-6, 13, 21 and 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom; and/or
a light immunoglobulin chain comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom.

15 22. The method of claim 21 wherein the antibody or fragment comprises an antibody secreted from the host cells that comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9.

23

23. The method of claim 22 wherein the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1 constant immunoglobulin chain.

5 24. The method of claim 23 further comprising recovering the culture medium from the cells by disk-stack centrifuging the medium, depth filtering the medium and filtering the medium through a filter with about a 0.2 micron pore size.

10 25. The method of claim 24 further comprising purifying the immunoglobulins from the medium by column chromatographic fractionation.

26. An aqueous liquid cell culture medium comprising:

about 10 g/liter soy hydrolysate,

about 1.5 g/liter glucose,

15 about 150 mg/liter L-glutamine,

pH of about 6.8 ± 0.02 ,

HEPES,

Sodium bicarbonate buffers,

Inorganic salts,

20 Non-essential amino acids,

Recombinant human insulin,

Trace elements,

Surfactants,

an amino acid feed wherein the concentration of the components added by said amino acid

25 feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter
L-isooleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter

L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter
L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
Glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; wherein the medium does not comprise antibiotics, antimycotics or animal-derived components.

27. An aqueous liquid culture medium produced by a process comprising inoculating an
5 initial mammalian cell growth medium, pre-warmed to about 37°C; which medium comprises
HEPES, sodium bicarbonate buffers, inorganic salts, non-essential amino acids,
recombinant human insulin, trace elements and surfactants; and which does not comprise
L-glutamine, antibiotics, antimycotics or animal-derived components; with CHO DXB11 host
10 cells expressing an antibody light chain immunoglobulin and heavy chain immunoglobulin,
to a cell density of about 2.5-5 X 10⁵ cells/ml; and, adding the following supplements to the
medium before, simultaneously with or immediately after said inoculation:
soy hydrolysate to a final concentration of about 10 g/liter;
and, optionally, an amino acid feed wherein the concentration of the components added by
said amino acid feed are approximately those set forth below:

L-arginine:	126.4 mg/liter
L-cystine:	34 mg/liter
L-histidine:	42 mg/liter
L-isoleucine:	52 mg/liter
L-leucine:	52 mg/liter
L-lysine:	72 mg/liter
L-Methionine:	15.2 mg/liter
L-phenylalanine:	33 mg/liter
L-threonine:	47.6 mg/liter
L-tryptophan:	10.2 mg/liter
L-tyrosine:	36 mg/liter
L-valine:	46.8 mg/liter
L-alanine:	8.9 mg/liter
L-asparagine:	30 mg/liter

38

L-aspartic acid:	26.6 mg/liter
L-glutamic acid:	29.4 mg/liter
Glycine:	15 mg/liter
L-proline:	23 mg/liter
L-serine:	21 mg/liter

; and, when viable cell density reaches over about 1.2×10^6 cells/ml, adding supplement feeds wherein the concentration of the components added by said supplement feeds are approximately those set forth below:

Sodium selenite:	0.01426 mg/liter
Adenine sulfate:	1.632 mg/liter
Adenosine:	17.6 mg/liter
Cytidine:	17.6 mg/liter
Guanosine:	17.6 mg/liter
Uridine:	17.6 mg/liter
Hypoxanthine:	11.8 mg/liter
L-citrulline:	12.6 mg/liter
L-ornithine-HCl:	25.6 mg/liter
Biotin:	0.28 mg/liter
Flavin Adenine Dinucleotide:	0.05 mg/liter
Folic Acid:	4.6 mg/liter
Lipoic Acid:	0.52 mg/liter
Niacin:	31.4 mg/liter
Pyridoxine HCl:	3 mg/liter
Riboflavin:	1.86 mg/liter
Thiamine HCl:	16 mg/liter
Vitamin E:	0.376 mg/liter
Vitamin B12:	3.4 mg/liter
Choline Chloride:	50.2 mg/liter
Ethanolamine HCl:	4.4 mg/liter
i-Inositol:	73.2 mg/liter
Thymidine:	7.8 mg/liter
Putrescine 2HCl:	0.4 mg/liter
Progesterone:	0.015 mg/liter
D-Calcium Pantothenate:	23.8 mg/liter
L-asparagine:	812 mg/liter
L-proline	216 mg/liter

L-isoleucine	370 mg/liter
L-cysteine-HCl	224 mg/liter
L-leucine	332 mg/liter
L-threonine	164 mg/liter
L-tyrosine	198 mg/liter
L-arginine	186 mg/liter
L-aspartic acid	71 mg/liter
L-glutamic acid	126 mg/liter
Glycine	57 mg/liter
L-histidine	125 mg/liter
L-methionine	132 mg/liter
L-tryptophan	99 mg/liter
L-lysine	293 mg/liter
L-phenylalanine	174 mg/liter
L-valine	262 mg/liter
L-serine:	260 mg/liter
Sodium phosphate monobasic:	288.2 mg/liter
Zinc sulfate:	1.08 mg/liter
Cupric sulfate:	0.0032 mg/liter
Ammonium vanadate:	0.00078 mg/liter
Cobalt chloride:	0.0025 mg/liter
Nickel dichloride hexahydrate:	0.0004 mg/liter
Sodium molybdate dehydrate:	0.00016 mg/liter

; and, maintaining glucose concentration in the medium at about 1.5 g/liter and maintaining L-glutamine concentration in the medium at about 150 mg/liter; and during cell growth maintaining O₂ concentration at about 60%; pH at about 6.8 ± 0.02 and temperature at about 36.5°C ± 0.5°C.

5

28. The aqueous liquid culture medium of claim 27 wherein the host cells comprise a vector encoding the immunoglobulins of the antibody wherein the antibody is secreted into the medium.

10

29. The aqueous liquid culture medium of claim 28 wherein the host cell viability is about 60% or lower and/or wherein host cell growth has proceeded for about 14 to 24 days.

30. The aqueous liquid culture medium of claim 29 wherein the host cells are removed from the medium.

31. The aqueous liquid culture medium of claim 30 wherein the host cells are removed from the medium by centrifuging the medium and/or depth filtering the medium and/or filtering the medium through a 0.2 micron filter.
- 5 32. The aqueous liquid culture medium of claim 31 wherein the antibody binds specifically to IGF1R.
33. The aqueous liquid culture medium of claim 32 wherein the heavy immunoglobulin chain
10 comprises the amino acid sequence set forth in a member selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, -6, 13, 21 and 26; or a mature fragment thereof or one or more CDRs therefrom;
and a light immunoglobulin chain comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 and 25, or a mature fragment thereof or one or
15 more CDRs therefrom.
34. The aqueous liquid culture medium of claim 33 wherein the antibody or fragment is an antibody that is secreted from the host cell that comprises a light chain immunoglobulin comprising amino acids 20-128 of SEQ ID NO: 3, 4, 5, or 6; and a heavy chain
20 immunoglobulin comprising amino acids 20-137 of SEQ ID NO: 8 or 9.
35. The aqueous liquid culture medium of claim 34 wherein the light chain immunoglobulin is linked to a kappa constant immunoglobulin chain and the heavy chain immunoglobulin is linked to a gamma-1 constant immunoglobulin chain.
25
36. A vessel comprising the aqueous liquid culture medium of claim 27.
37. The vessel of claim 36 which is a flask, a bioreactor, a tank bioreactor, a bag bioreactor or a disposable bioreactor.
30
38. The vessel of claim 37 which bioreactor is a stirred tank bioreactor, a bubble column bioreactor, an air lift bioreactor, a fluidized bed bioreactor or a packed bed bioreactor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/058164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/00 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/23527 A (BAXTER AG [AT]) 5 April 2001 (2001-04-05) e.g. page 5, lines 1-15; page 5, lines 1-15; pages 8-9; claims 1,9,10,12,14 the whole document	1-38
Y	WO 03/100008 A (SCHERING CORP [US]; WANG YAN [US]; GREENBERG ROBERT [US]; PRESTA LEONA) 4 December 2003 (2003-12-04) e.g. example 6 the whole document	1-38
A	US 2005/170462 A1 (MORRIS ARVIA E [US] ET AL) 4 August 2005 (2005-08-04) e.g. examples 3, 15 the whole document	1-38
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 2009

Date of mailing of the international search report

14/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/058164

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANONYMOUS: "ATCC® High-Performance Media and Sera"[Online] 2006, pages 1-8, XP002557593 Retrieved from the Internet: URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/Portals/5/Pdf/mediabrochure.pdf> [retrieved on 2009-11-26] the whole document -----	1-38
A	"QUEST INTERNATIONAL PRODUCT INFORMATION" INTERNET CITATION, [Online] pages 1-2, XP002156903 Retrieved from the Internet: URL: http://www.sheffield-products.com> [retrieved on 2001-01-10] the whole document -----	1-38
A	ANONYMOUS: "CHO Medium Component Optimization Kit 2"[Online] 2004, pages 1-10, XP002557594 Retrieved from the Internet: URL: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/c4364bul.Par.0001.File.tmp/c4364bul.pdf> [retrieved on 2009-11-26] the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/058164

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0123527	A	05-04-2001	AU 780791 B2	14-04-2005
			AU 7908300 A	30-04-2001
			CA 2385299 A1	05-04-2001
			CN 1391604 A	15-01-2003
			CN 101173246 A	07-05-2008
			CZ 20021096 A3	15-01-2003
			DE 60028989 T2	25-01-2007
			DK 1220893 T3	23-10-2006
			EP 1220893 A1	10-07-2002
			ES 2265991 T3	01-03-2007
			HU 0202759 A2	28-12-2002
			JP 2003510070 T	18-03-2003
			PL 355233 A1	05-04-2004
			PT 1220893 E	31-10-2006
			SK 4002002 A3	02-07-2002
			TR 200200757 T2	23-09-2002
WO 03100008	A	04-12-2003	AU 2003241590 A1	12-12-2003
			CA 2484000 A1	04-12-2003
			CN 1671837 A	21-09-2005
			EP 1506286 A2	16-02-2005
			JP 2005527222 T	15-09-2005
			JP 2006265262 A	05-10-2006
			MX PA04011624 A	07-03-2005
			NZ 536475 A	30-06-2008
US 2005170462	A1	04-08-2005	NONE	31-01-2009

38

UB06873seqlist
SEQUENCE LISTING

<110> Schering Corp.
<120> High titer antibody production
<130> UB06873
<150> 61/100,450
<151> 2008-09-26
<160> 26
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15
Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Val Pro Asp Phe Gln Ser Val
20 25 30
Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45
Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
50 55 60
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
85 90 95
Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110
Leu Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125
<210> 2
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

UB06873seq1ist

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

30

UB06873seqlist

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 5
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 6
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

UB06873seq1ist

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 7
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 8
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

34

UB06873seq1ist

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 9
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Val
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Ile Gly Val Ala Ala Ser Tyr Tyr
115 120 125
Phe Gly Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 10
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Arg Ile Gly Val Ala Ala Ser Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys

40

UB06873seqlist

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Met Pro Val Ala Gly Pro Gly Tyr Phe
115 120 125

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
130 135 140

Ser Ser

145

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gly Met Pro Val Ala Gly Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 21
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

11

UB06873seqlist

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

UB06873seqlist

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

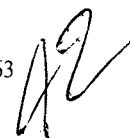
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu His Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys
85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105



Producción de Altos Títulos de Anticuerpos

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/100.450; presentada el 26 de Septiembre de 2008, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Campo del Invento

El presente invento se relaciona, generalmente con un método de producir grandes cantidades de una proteína, como por ejemplo un anticuerpo, en un cultivo celular; junto con el cultivo celular mismo.

Fundamento del Invento

Cultivar células para la producción comercial de proteínas terapéuticas es un proceso costoso. El equipo requerido es costoso y los costos de investigación, desarrollo y producción son altos. El desarrollo de procesos de cultivo que maximicen la cantidad de proteína terapéutica producida por litro de cultivo celular minimizará las fuentes necesarias para producir una cantidad dada de la proteína. Por lo tanto, es deseable utilizar procesos comercialmente viables que produzcan grandes cantidades de proteínas.

Muchas células de ocurrencia natural no producen grandes cantidades de las proteínas deseadas, bajo condiciones estándares de cultivo. Mejor dicho, debe realizarse una labor de investigación y desarrollo extensiva de procesos de cultivo celular, los cuales inciten a células en cultivo a generar grandes cantidades de proteína terapéutica. Típicamente, identificar las condiciones óptimas de cultivo celular es difícil y requiere una cantidad significativa de aporte inventivo.

Resumen del Invento

El presente invento, generalmente proporciona métodos y composiciones para generar altas cantidades de proteína desde células en cultivo mediante el uso de varios suplementos de cultivo y otras alteraciones a las condiciones de cultivo.

El presente invento proporciona un método para producir una proteína el cual comprende
inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial con células huésped que expresan la
proteína y agregar suplementos que comprenden aquellos divulgados a continuación,
opcionalmente a concentraciones indicadas aproximadas (sin incluir la cantidad de cada
5 componente desde otras fuentes tales como desde el medio de cultivo celular mamífero inicial):

	Sulfato de adenina:	1.632 mg/litro
	Adenosina:	17.6 mg/litro
	Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
	Biotina:	0.28 mg/litro
10	Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
	Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
	Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
	Citidina:	17.6 mg/litro
	Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
15	Etanolamina HQ:	4.4 mg/litro
	Dinucleótido de Flavina Adenina:	0.05 mg/litro
	Ácido Fólico:	4.6 mg/litro
	Glicina:	72 mg/litro
	Guanosina:	17.6 mg/litro
20	Hipoxantina:	11.8 mg/litro
	L- inositol:	73.2 mg/litro
	L- alanina:	8.9 mg/litro
	L- arginina:	312.4 mg/litro
	L- asparagina:	842 mg/litro
25	Ácido L- aspártico:	97.6 mg/litro
	L- citrulina:	12.6 mg/litro
	L- cisteína- HCl:	224 mg/litro
	L- cistina:	34 mg/litro
	Ácido L- glutámico:	155,4 mg/litro
30	L- histidina:	167 mg/litro
	Ácido lipóico:	0.52 mg/litro

13

	L- isoleucina:	422 mg/litro
	L- leucina:	384 mg/litro
	L- lisina:	365 mg/litro
	L- metionina:	147,2 mg/litro
5	L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
	L- fenilalanina:	207 mg/litro
	L- prolina:	239 mg/litro
	L- serina:	281 mg/litro
	L- treonina:	211,6 mg/litro
10	L- triptófano:	109,2 mg/litro
	L- tirosina:	234 mg/litro
	L- valina:	308,8 mg/litro
	Cloruro tetrahidrato de manganeso:	0.0003 mg/litro
	Niacina:	31.4 mg/litro
15	Dicloruro hexahidrato de Níquel :	0.0004 mg/litro
	Progesterona:	0.015 mg/litro
	Putrescina 2HCl:	0.4 mg/litro
	Piridoxina HCl:	3 mg/litro
	Riboflavina:	1.86 mg/litro
20	Molibdato deshidrato de sodio:	0.00016 mg/litro
	Fosfato monobásico sódico:	288.2 mg/litro
	Selenito sódico:	0.01426 mg/litro
	HCl de Tiamina:	16 mg/litro
	Timidina:	7.8 mg/litro
25	Cloruro deshidrato de estaño:	0.00008 mg/litro
	Uridina:	17.6 mg/litro
	Vitamina B12:	3.4 mg/litro
	Vitamina E:	0.376 mg/litro
	Sulfato de Zinc:	1.08 mg/litro
30	Glucosa:	1,5 g/litro
	L- glutamina:	150 mg/litro

En una realización del invento, algunos suplementos se agregan a partir de una solución stock de aminoácidos (ej., una solución stock 50x) que comprende aminoácidos en aproximadamente las siguientes concentraciones

	L- arginina:	6.32 g/litro
5	L- cistina:	1.7 g/litro
	L- histidina:	2.1 g/litro
	L- isoleucina:	2.6 g/litro
	L- leucina:	2.6 g/litro
	L- lisina:	3.6 g/litro
10	L- Metionina:	0.76 g/litro
	L- fenilalanina:	1.65 g/litro
	L- treonina:	2.38 g/litro
	L- triptófano:	0.51 g/litro
	L- tirosina:	1.8 g/litro
15	L- valina:	2.34 g/litro

En una realización del invento, aproximadamente 20 ml de solución stock de aminoácidos por litro de cultivo. En una realización del invento, los siguientes suplementos se agregan a partir de una solución stock de aminoácidos (ej., una solución stock 100x) que comprende aminoácidos en aproximadamente las siguientes concentraciones:

	L- alanina:	0.89 g/litro
	L- asparagina:	1.5 g/litro
	Ácido L- aspártico:	1.33 g/litro
25	Ácido L- glutámico:	1.47 g/litro
	Glicina:	0.75 g/litro
	L- prolina:	1.15 g/litro
	L- serina:	1.05 g/litro

En una realización del invento, la solución stock de aminoácidos se agrega a aproximadamente 10 ml de alimento aminoácido por litro de cultivo. En una realización del

invento, algunos suplementos se agregan a partir de una solución stock de aminoácidos (ej., una solución stock 50x) que comprende suplementos en las siguientes concentraciones:

	L- asparagina:	40.6 g/litro
5	L- prolina:	10,81 g/litro
	L- isoleucina:	18,53 g/litro
	L- cisteína- HCl:	11,19 g/litro
	L- leucina:	16,58 g/litro
	L- treonina:	8.2 g/litro
10	L- tirosina:	9.9 g/litro
	L- arginina:	9.29 g/litro
	Ácido L- aspártico:	3,56 g/litro
	Ácido L- glutámico:	6,28 g/litro
	Glicina:	2.83 g/litro
15	L- histidina:	6.23 g/litro
	L- metionina:	6.58 g/litro
	L- triptófano:	4.93 g/litro
	L- lisina:	14.66 g/litro
	L- fenilalanina:	8.64 g/litro
20	L- valina:	13.08 g/litro
	L- serina:	13 g/litro
	Fosfato monobásico sódico:	14.41 g/litro
	Sulfato de Zinc:	0.054 g/litro
	Sulfato cúprico	0.00016 g/litro
25	Vanadato de amonio:	0.000039 g/litro
	Cloruro de cobalto:	0.000125 g/litro
	Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.00002 g/litro
	Molibdato dehidrato de sodio:	0.000008 g/litro
	Cloruro dehidrato de estaño:	0.000004 g/litro
30	Cloruro de manganeso: tetrahidrato:	0.000015 g/litro

En una realización del invento, se agregó aproximadamente 20 ml de solución stock de alimento nutriente por litro de cultivo. En una realización del invento, algunos suplementos se agregan a partir de una solución stock de alimento de vitamina/sal (ej., una solución stock 50x) que comprende suplementos en las siguientes concentraciones:

5		
	Selenito sódico:	7.13×10^{-4} g/litro
	Sulfato de adenina:	0.0816 g/litro
	Adenosina:	0.88 g/litro
	Citidina:	0.88 g/litro
10	Guanosina:	0.88 g/litro
	Uridina:	0.88 g/litro
	Hipoxantina:	0.59 g/litro
	L- citrulina:	0.63 g/litro
	L- ornitina- HCl:	1.28 g/litro
15	Biotina:	0.014 g/litro
	Dinucleótido de Flavina Adenina:	0.0025 g/litro
	Ácido Fólico:	0.23 g/litro
	Ácido lipóico:	0.026 g/litro
	Niacina:	1.57 g/litro
20	HCl de Piridoxina:	0.15 g/litro
	Riboflavina:	0.093 g/litro
	HCl de Tiamina:	0.8 g/litro
	Vitamina E:	0.0188 g/litro
	Vitamina B12:	0.17 g/litro
25	Cloruro de colina:	2.51 g/litro
	HCl de etano lamina :	0.22 g/litro
	L- inositol:	3.66 g/litro
	Timidina:	0.39 g/litro
	2HCl de Putrescina:	0.02 g/litro
30	Progesterona:	0.00075 g/litro
	Pantotenato de D- calcio:	1.19 g/litro

En una realización del invento, se agrega aproximadamente 20 ml de alimento de vitamina/sal por litro de cultivo. En una realización del invento, el método además que comprende cosechar el medio de cultivo desde las células; en donde dicha proteína se secreta a partir de dichas células en el medio. Por ejemplo, en una realización del invento, el medio de cultivo se cosechó a partir de células cuando la variabilidad de las células está por debajo de 60% aproximadamente. El medio de cultivo puede cosecharse a partir de células, por ejemplo, al centrifugar el medio y/o filtración profunda del medio y/o filtración del medio a través de un filtro de 0.2 micras. La proteína expresada utilizando el método del invento, puede ser cualquier proteína, por ejemplo, un fragmento fijador de anticuerpo o antígenos del mismo, ej., que específicamente se fija a IGF1R, ej., en donde el anticuerpo o fragmento comprende una cadena de inmunoglobulina pesada que comprende la secuencia aminoácida divulgada en un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3, 6, 13, 21 y 26; ó un fragmento maduro de los mismos ó uno o más CDRs de los mismos; y una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOS: 2, 7- 9, 17 y 25, ó un fragmento maduro del mismo ó uno o más CDRs de los mismos; por ejemplo, en donde el anticuerpo ó fragmento es un anticuerpo entero que comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20- 137 de SEQ ID NO: 8 ó 9, ej., en donde la inmunoglobulina de cadena liviana es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante y la inmunoglobulina de cadena pesada es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1. En una realización del invento, el medio de crecimiento celular mamífero inicial al cual los suplementos se agregan comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y no comprende elementos derivados de L-glutamina, antibióticos, antimicóticos o animales.

El presente invento incluye dentro de su alcance un método para producir un antibiótico (ej., monoclonal, recombinante y/o completamente humano) que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial, pre- calentado a 37°C; tal medio comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y el cual no comprende componentes derivados de

L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o animales; con células huésped CHO DXB11 que expresan la inmunoglobulina de cadena liviana de anticuerpo e inmunoglobulina de cadena pesada, a una densidad celular de 2.5- 5 X 10⁵ células/ml aproximadamente; y agregar los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente con o inmediatamente después de dicha
5 inoculación: Hidrolisato de soya a una concentración final de 10 g/litro aproximadamente; y, opcionalmente, aminoácidos a las siguientes concentraciones finales (sin incluir la cantidad de dichos aminoácidos desde otras fuentes tales como el medio de crecimiento celular mamífero inicial):

	L- arginina:	126.4 mg/litro
10	L- cistina:	34 mg/litro
	L- histidina:	42 mg/litro
	L- isoleucina:	52 mg/litro
	L- leucina:	52 mg/litro
	L- lisina:	72 mg/litro
15	L- Metionina:	15.2 mg/litro
	L- fenilalanina:	33 mg/litro
	L- treonina:	47.6 mg/litro
	L- triptófano:	10.2 mg/litro
	L- tirosina:	36 mg/litro
20	L- valina:	46.8 mg/litro
	L- alanina:	8.9 mg/litro
	L- asparagina:	30 mg/litro
	Ácido L- aspártico:	26.6 mg/litro
	Ácido L- glutámico:	29.4 mg/litro
25	Glicina:	15 mg/litro
	L- prolina:	23 mg/litro
	L- serina:	21 mg/litro;

y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1.2 10⁶ células/ml aproximadamente,
30 agregando alimentos suplementarios en donde los componentes desde dichos alimentos

suplementarios (sin incluir la cantidad de cada componentes desde otros alimentos) alcanzan una concentración de cultivo final aproximado divulgada a continuación.

	Selenito sódico:	0.01426 mg/litro
	Sulfato de adenina	1.632 mg/litro
5	Adenosina:	17.6 mg/litro
	Citidina:	17.6 mg/litro
	Guanosina:	17.6 mg/litro
	Uridina:	17.6 mg/litro
	Hipoxantina:	11.8 mg/litro
10	L- citrulina:	12.6 mg/litro
	L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
	Biotina:	0.28 mg/litro
	Dinucleotido de Flavina Adenina:	0.05 mg/litro
	Ácido Fólico:	4.6 mg/litro
15	Ácido lipoico:	0.52 mg/litro
	Niacina:	31.4 mg/litro
	HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
	Riboflavina:	1.86 mg/litro
	HCl de Tiamina:	16 mg/litro
20	Vitamina E:	0.376 mg/litro
	Vitamina B12:	3.4 mg/litro
	Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
	HCl de etanolamina :	4.4 mg/litro
	L- Inositol:	73.2 mg/litro
25	Timidina:	7.8 mg/litro
	Putrescina 2HCl:	0.4 mg/litro
	Progesterona:	0.015 mg/litro
	Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
	L- asparagina:	812 mg/litro
30	L- prolina:	216 mg/litro
	L- isoleucina:	370 mg/litro

	L- cisteína- HCl:	224 mg/litro
	L- leucina:	332 mg/litro
	L- treonina:	164 mg/litro
	L- tirosina:	198 mg/litro
5	L- arginina:	186 mg/litro
	Ácido L- aspártico:	71 mg/litro
	Ácido L- glutámico:	126 mg/litro
	Glicina:	57 mg/litro
	L- histidina:	125 mg/litro
10	L- metionina:	132 mg/litro
	L- triptófano:	99 mg/litro
	L- lisina:	293 mg/litro
	L- fenilalanina:	174 mg/litro
	L- valina:	262 mg/litro
15	L- serina:	260 mg/litro
	Fosfato monobásico sódico:	288.2 mg/litro
	Sulfato de Zinc:	1.08 mg/litro
	Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
	Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
20	Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
	Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro
	Molibdato dehidrato de sodio:	0.00016 mg/litro

 ; y, durante el crecimiento celular, agregar glucosa al medio cuando los niveles de glucosa caen por debajo de 1.5 g/litro aproximadamente y agregar L- glutamina cuando los niveles de L- glutamina caen por debajo de 150 mg/litro aproximadamente; y durante crecimiento celular manteniendo la concentración de O₂ a 60%; pH a 6.8 ± 0.02 aproximadamente y temperatura a 36.5 °C ± 0.5°C. En una realización del invento, el anticuerpo comprende una cadena de inmunoglobulina pesada que comprende la secuencia aminoácida divulgada en un miembro seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3,- 6, 13, 21 y 26; ó un fragmento madura de los mismos ó uno o más CDRs de los mismos; y una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que

consta de SEQ ID NOs: 2, 7- 9, 17 y 25, ó un fragmento maduro del mismo ó uno o más CDRs de los mismos; por ejemplo, en donde el anticuerpo comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20- 137 de SEQ ID NO: 8 ó

5 9. Por ejemplo, en una realización del invento, la inmunoglobulina de cadena liviana es enlazada a una cadena inmunoglobulina constante kappa y la inmunoglobulina de cadena pesada es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1. El método opcionalmente comprende además recuperar el medio de cultivo desde las células mediante centrifugación disco apilado el medio, filtración profunda del medio y filtración del medio a través de un filtro con
10 tamaño de poro de 0.2 micras, y opcionalmente, el paso adicional de purificar cadenas de inmunoglobulina desde el medio mediante fraccionamiento cromatográfico de columna.

El presente invento también proporciona un medio de cultivo celular líquido que comprende:

- 15 Aproximadamente 10 g/litro de hidrolisato de soya,
- Aproximadamente 1.5 g/litro de glucosa,
- aproximadamente 150 mg/litro L- glutamina,
- pH de aproximadamente 6.8 ± 0.02 ,
- HEPES,
- Buffers de bicarbonato de sodio
- 20 Sales inorgánicas,
- Aminoácidos no esenciales,
- Insulina humana recombinante,
- Elementos traza,
- Surfactantes,

25 un alimento aminoácido en donde la concentración de los componentes agregados por dicha alimento aminoácida son aproximadamente divulgados a continuación.

	L- arginina:	126.4 mg/litro
	L- cistina:	34 mg/litro
	L- histidina:	42 mg/litro
30	L- isoleucina:	52 mg/litro
	L- leucina:	52 mg/litro

	L- lisina:	72 mg/litro
	L- Metionina:	15.2 mg/litro
	L- fenilalanina:	33 mg/litro
	L- treonina:	47.6 mg/litro
5	L- triptófano:	10.2 mg/litro
	L- tirosina:	36 mg/litro
	L- valina:	46.8 mg/litro
	L- alanina:	8.9 mg/litro
	L- asparagina:	30 mg/litro
10	Ácido L- aspártico:	26.6 mg/litro
	Ácido L- glutámico:	29.4 mg/litro
	Glicina:	15 mg/litro
	L- prolina:	23 mg/litro
	L- serina:	21 mg/litro;

15 En donde el medio no comprende antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales. Además el presente invento proporciona un cultivo celular en el cual una célula que expresa una inmunoglobulina de interés ha sido cultivada.

 Por ejemplo, el presente invento proporciona un medio de cultivo líquido producido mediante un proceso que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial, pre- calentado a 37°C; tal medio comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y el cual no comprende L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con células huésped CHO DXB11 que expresan la inmunoglobulina de cadena liviana de anticuerpo e inmunoglobulina de cadena pesada, a una densidad celular de 2.5-
20 5 X 10⁵ células/ml aproximadamente; y agregar los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente con o inmediatamente después de dicha inoculación: Hidrolisato de soya a una
25 concentración final de 10 g/litro aproximadamente;

 y, opcionalmente, un alimento aminoácido en donde la concentración de los componentes agregados por dicha alimento aminoácida son aproximadamente divulgados a continuación.

30	L- arginina:	126.4 mg/litro
----	--------------	----------------

	L- cistina:	34 mg/litro
	L- histidina:	42 mg/litro
	L- isoleucina:	52 mg/litro
	L- leucina:	52 mg/litro
5	L- lisina:	72 mg/litro
	L- Metionina:	15.2 mg/litro
	L- fenilalanina:	33 mg/litro
	L- treonina:	47.6 mg/litro
	L- triptófano:	10.2 mg/litro
10	L- tirosina:	36 mg/litro
	L- valina:	46.8 mg/litro
	L- alanina	8.9 mg/litro
	L- asparagina:	30 mg/litro
	Ácido L- aspártico:	26.6 mg/litro
15	Ácido L- glutámico:	29.4 mg/litro
	Glicina:	15 mg/litro
	L- prolina:	23 mg/litro
	L- serina:	21 mg/litro

; y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1.2×10^6 células/ml

- 20 aproximadamente, agregar alimentos suplementarios en donde las concentraciones de los componentes agregados por dichos alimentos suplementarios son aproximadamente aquellas divulgadas a continuación.

	Selenito sódico:	0.01426 mg/litro
	Sulfato de adenina	1.632 mg/litro
25	Adenosina:	17.6 mg/litro
	Citidina:	17.6 mg/litro
	Guanosina:	17.6 mg/litro
	Uridina:	17.6 mg/litro
	Hipoxantina:	11.8 mg/litro
30	L- citrulina:	12.6 mg/litro
	L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro

	Biotina:	0.28 mg/litro
	Dinucleotido de Flavina Adenina:	0.05 mg/litro
	Ácido Fólico:	4.6 mg/litro
	Ácido lipoico:	0.52 mg/litro
5	Niacina:	31.4 mg/litro
	HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
	Riboflavina:	1.86 mg/litro
	HCl de Tiamina:	16 mg/litro
	Vitamina E:	0.376 mg/litro
10	Vitamina B12:	3.4 mg/litro
	Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
	HCl de etanolamina :	4.4 mg/litro
	L- Inositol:	73.2 mg/litro
	Timidina	7.8 mg/litro
15	2HCl de Putrescina:	0.4 mg/litro
	Progesterona:	0.015 mg/litro
	Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
	L- asparagina:	812 mg/litro
	L- prolina	216 mg/litro
20	L- isoleucina	370 mg/litro
	L- cisteína- HCl	224 mg/litro
	L- leucina:	332 mg/litro
	L- treonina:	164 mg/litro
	L- tirosina:	198 mg/litro
25	L- arginina:	186 mg/litro
	Ácido L- aspártico:	71 mg/litro
	Ácido L- glutámico:	126 mg/litro
	Glicina:	57 mg/litro
	L- histidina:	125 mg/litro
30	L- metionina:	132 mg/litro
	L- triptófano:	99 mg/litro

	L- lisina:	293 mg/litro
	L- fenilalanina:	174 mg/litro
	L- valina:	262 mg/litro
	L- serina:	260 mg/litro
5	Fosfato monobásico sódico:	288.2 mg/litro
	Sulfato de Zinc:	1.08 mg/litro
	Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
	Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
	Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
10	Dicloruro hexahidrato de Níquel:	0.0004 mg/litro
	Molibdato dehidrato de sodio:	0.00016 mg/litro

y, durante crecimiento celular, agregar glucosa al medio cuando los niveles de glucosa caen por debajo de 1.5 g/litro aproximadamente y agregar L- glutamina cuando los niveles de L- glutamina caen por debajo de 150 mg/litro aproximadamente; y durante crecimiento celular

15 mantener la concentración de O₂ en 60% aproximadamente; pH en 6.8 ± 0.02 aproximadamente y la temperatura en 36.5°C ± 0.5°C; en donde la variabilidad celular es 60% aproximadamente o menos. En una realización del invento, el medio de cultivo incluye células huésped las cuales comprenden un vector que codifica un fragmento fijador de anticuerpos o antígenos del mismo; opcionalmente, en donde el anticuerpo o fragmento secretado por la célula huésped está en el

20 medio. Por ejemplo, en una realización del invento, las inmunoglobulinas forman un fragmento fijador de anticuerpos o antígenos de las mismas que específicamente se fija a IGF1R, ej., en donde el anticuerpo o fragmento comprende una cadena de inmunoglobulina pesada que comprende la secuencia aminoácida divulgada en un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3,- 6, 13, 21 y 26; ó un fragmento maduro de los mismos ó uno o

25 más CDRs de los mismos; y una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 7- 9, 17 y 25, ó un fragmento maduro de las mismas ó uno o más CDRs de las mismas; por ejemplo, en donde el anticuerpo comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende

30 los aminoácidos 20- 137 de SEQ ID NO: 8 ó 9. Por ejemplo, en una realización del invento, la inmunoglobulina de cadena liviana es enlazada a una cadena inmunoglobulina constante kappa y

la inmunoglobulina de cadena pesada es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1. Por ejemplo, en donde las células huésped comprenden un vector que codifica inmunoglobulinas de un fragmento fijador de anticuerpos o antígenos de las mismas en donde el anticuerpo o fragmento es secretado en el medio. En una realización del invento, la viabilidad de la célula huésped es 60% aproximadamente o menor y/o en donde el crecimiento celular ha seguido su curso durante aproximadamente 14- 24 días (ej., 14 días aproximadamente, 15 días aproximadamente, 16 días aproximadamente, 17 días aproximadamente, 18 días aproximadamente, 19 días aproximadamente, 20 días aproximadamente, 21 días aproximadamente, 22 días aproximadamente, 23 días aproximadamente, ó días aproximadamente), ej., al centrifugar el medio y células y retirar las células desde el medio, ej., en donde el medio también es filtrado en profundidad y/o filtrado a través de un filtro de 0.2 micras, por ejemplo, después de centrifugación. Cualquier medio que comprende las características del medio generado como se divulgó anteriormente forma parte del presente invento sin considerar el proceso mediante el cual el medio se preparó actualmente.

El presente invento también proporciona un recipiente (ej., un matraz, un biorreactor, un biorreactor de bolsa o un biorreactor desechable, un biorreactor de tipo tanque agitado, un biorreactor de columna de burbujas, un biorreactor de elevación con aire, un biorreactor de lecho fluidizado, o un biorreactor de lecho empacado) que comprende cualquier medio de cultivo del invento.

Descripción Detallada del Invento

La presente solicitud incluye procesos para producción de anticuerpos (ej., anti- IGF1R) desde células mamíferas tales como células CHO (Ovario de Hámster Chino).

Los procesos son corridos en una variedad de sistemas de cultivos de birreactor, incluyendo biorreactores de tipo tanque agitado, biorreactores de bolsa y biorreactores desechables, y matraces de agitación

El proceso de producción “nivel 3” proporciona, en promedio, un título de 1.2 g/L de anticuerpo y una productividad específica de cultivo de 22 pg/célula/día. El proceso “aumentado”

proporciona, en promedio, un título de 2,3 g/L de anticuerpo, con una productividad específica de 30 pg/célula/día aproximadamente. Ambos procesos involucran la adición de suplementos

específicos al cultivo del biorreactor en producción bien sea antes de inoculación o como alimentos en curso para aumentar productividad específica de cultivo, título, biomasa, y viabilidad del cultivo. Para el proceso nivel 3, tres suplementos son añadidos- hidrolisatos de trigo y/o soya (alimentos de hidrolisatos) son añadidos (ej., como soluciones de 200 g/L

5 (acuosas) para aumentar la productividad específica del cultivo. Cualquiera ambos hidrolisatos o el alimento de hidrolisatos de soya por si mismo se agregan típicamente al cultivo. Dos soluciones alimento concentradas de aminoácidos (alimentos de aminoácidos) se agregan para elevar la biomasa del cultivo y aumentar los títulos del proceso. Una vitamina concentrada y solución de sal (alimento vitamina/alimento de sal) se agrega para estabilizar la viabilidad del
10 cultivo y aumentar biomasa. La solución de alimento de vitamina incluye, por ejemplo, biotina, progesterona, inositol, ácidos nucleicos, citrulina, hipoxantina, ácido lipoico, riboflavina, tiamina, colina. etanolamina, ácido fólico, flavina, y vitamina B12.

Para el proceso mejorado, se agregan las soluciones alimento, junto con una solución nutriente concentrada adicional (alimento nutriente). El "alimento nutriente" incluye, por
15 ejemplo, aminoácidos, sulfato de zinc, sulfato cúprico, vanadato de amonio, cloruro de cobalto, bicloruro de níquel, cloruro de estaño, y cloruro de manganeso. Puede agregarse antes de inoculación o como un alimento en curso para mejorar título de proceso y aumentar viabilidad.

Además, un cambio en osmolalidad en curso (a 400- 500 mOsm) opcionalmente se emplea mediante la adición de una solución de sal concentrada, solución de hidrolisato o dióxido
20 de carbono e hidróxido de sodio (como parte del control de pH para el birreactor). El cambio de osmolalidad se emplea con el objeto de aumentar la productividad específica de cultivo y mejorar viabilidad de cosecha. Además, un cambio de reducción en temperatura en curso, desde 36°C a 37°C a 33- 35°C, opcionalmente se utiliza para estabilizar la viabilidad del cultivo durante los altos conteos celulares viables.

25 Para los propósitos del presente invento, el término "en proceso" se refiere a un evento que ocurre durante crecimiento de un cultivo celular de producción después de una inoculación celular inicial (ej., de células expandidas, por ejemplo, para un banco celular maestro o banco celular de trabajo).

Un cultivo celular de producción" se refiere al cultivo celular desde el cual un producto
30 final, tal como un anticuerpo (ej., anti- IGF1R) se aísla.

Una “cultivo celular de expansión” se refiere a células o un cultivo de células a utilizarse para inoculación inicial de un cultivo celular de producción.

Una solución stock “nX” de suplementos (en donde n es un número, tal como 50), indica que la solución stock es diluida por 1/n cuando se agrega al cultivo. Por ejemplo, una solución
 5 stock 50x es normalmente diluida 1/50 cuando se agrega a un cultivo.

Alimentos

Los procesos del presente invento incluyen pasos en donde varios alimentos se incluyen en un medio de crecimiento celular mamífero inicial. Estos alimentos incluyen alimento de
 10 hidrolisatos, alimento de vitamina/sal, alimento aminoácido y alimento nutriente. Dependiendo del tipo de proceso de cultivo celular utilizado, el nivel 3 o el proceso mejorado, los alimentos pueden agregarse en diferentes puntos.

El “medio de crecimiento celular mamífero inicial” puede ser cualquiera de los diferentes tipos de medios acuosos conocidos en el estado de la técnica; y el significado de este término
 15 fácilmente será reconocido por cualquier médico con experiencia común en el estado de la técnica. Ejemplos incluyen medio EX- CELL ACF CHO (Sigma- Aldrich (St.Louis, MO); discutido adicionalmente a continuación), DMEM, DMEM/F- 12, Mezcla Nutriente F- 10, Medio 1640 RPMI , Mezcla Nutriente F- 12, Medio 199, Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle, RPMI, medio 293 , y medio Iscove . Por ejemplo, el medio esencial mínimo Eagle
 20 (MEM) comprende hidrocloreuro de L- Arginina (126 mg/l), 2HCl de L- Cistina (31 mg/l), hidrocloreuro de L- Histidina- H₂O (42 mg/l), L- Isoleucina (52 mg/l), L- Leucina (52 mg/l), hidrocloreuro de L- Lisina(73 mg/l), L- Metionina (15 mg/l), L- fenilalanina (32 mg/l), L- Treonina (48 mg/l), L- Triptófano (10 mg/l), L- dehidrato de sal de disodio de tirosina (52 mg/l), L- Valina (46 mg/l), Cloruro de colina (1 mg/l), pantotenato de D- calcio (1 mg/l), Ácido fólico
 25 (1 mg/l), Niacinamida (1 mg/l), hidrocloreuro de piridoxal (1 mg/l), Riboflavina (0.1 mg/l), hidrocloreuro de tiamina (1 mg/l), L- Inositol (2 mg/l), Cloruro de Calcio (CaCl₂) (anhidro) (200 mg/l), sulfato de magnesio (MgSO₄) (anhidro) (97.67 mg/l), Cloruro Potásico (KCl) (400 mg/l), Bicarbonato Sódico (NaHCO₃) (2200 mg/l), Cloruro Sódico (NaCl) (6800 mg/l), Fosfato Sódico monobásico (NaH₂PO₄- H₂O) (140 mg/l), D- Glucosa (Dextrosa) (1000 mg/l) y Rojo de Fenol (10
 30 mg/l).

Medio de Eagle modificado (MEM) (2X) comprende hidrocloreuro de L- Arginina (504 mg/l), L- Cistina (96 mg/l), L- Glutamina (870 mg/l), Hidrocloreuro de L- Histidina- H₂O (168 mg/l), L- Isoleucina (208 mg/l), L- Leucina (208 mg/l), Hidrocloreuro L- Lisina (290 mg/l), L- Metionina (60 mg/l), L- Fenilalanina (128 mg/l), L- Treonina (192 mg/l), L- Triptófano (40 mg/l), L- dehidrato de sal de disodio de tirosina (208 mg/l), L- Valina (155 mg/l), Cloruro de colina (4 mg/l), pantotenato de D- calcio (4 mg/l), Ácido fólico (4 mg/l), Niacinamida (4 mg/l), hidrocloreuro de piridoxal (4 mg/l), Riboflavina (0.4 mg/l), hidrocloreuro de tiamina (4 mg/l), L- Inositol (8 mg/l), Cloruro de Calcio (CaCl₂) (anhidro) (285 mg/l), Nitrato Férrico (Fe(NO₃)₃·9H₂O) (1 mg/l), sulfato de magnesio (MgSO₄) (anhidro) (195 mg/l), Cloruro Potásico (KCl) (800 mg/l), Bicarbonato Sódico (NaHCO₃) (8.400 mg/l), Cloruro Sódico (NaCl) (12.800 mg/l), Fosfato Sódico monobásico (NaH₂PO₄·H₂O) (250 mg/l), D- Glucosa (Dextrosa) (9.000 mg/l).

Medio RPMI 1640 (1X) comprende Glicina (10 mg/l), L- Arginina (200 mg/l), L- Asparagina (50 mg/l), L- Ácido aspártico (20 mg/l), 2HCl de L- Cistina (65 mg/l), L- Ácido glutámico (20 mg/l), L- Glutamina (300 mg/l), L- Histidina (15 mg/l), L- Hidroxiprolina (20 mg/l), L- Isoleucina (50 mg/l), L- Leucina (50 mg/l), Hidrocloreuro L- Lisina (40 mg/l), L- Metionina (15 mg/l), L- Fenilalanina (15 mg/l), L- Prolina (20 mg/l), L- Serina (30 mg/l), L- Treonina (20 mg/l), L- Triptófano (5 mg/l), L- Dehidrato de sal de disodio de tirosina (29 mg/l), L- Valina (20), Biotina (0.2 mg/l), Cloruro de colina (3 mg/l), pantotenato de D- calcio (0.25 mg/l), Ácido fólico (1 mg/l), Niacinamida (1 mg/l), Ácido para- aminobenzoico (1 mg/l), Hidrocloreuro piridoxina (1 mg/l), Riboflavina (0.2 mg/l), hidrocloreuro de tiamina (1 mg/l), Vitamina B12 (0.005 mg/l), L- Inositol (35 mg/l), Nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O) (100 mg/l), sulfato de magnesio (MgSO₄) (anhidro) (48,84 mg/l), Cloruro Potásico (KCl) (400 mg/l), Bicarbonato Sódico (NaHCO₃) (2.000 mg/l), Cloruro Sódico (NaCl) (6.000 mg/l), Fosfato Sódico dibásico (NaH₂PO₄) (800 mg/l), D- Glucosa (Dextrosa) (2.000 mg/l) y Glutathione (reducida) (1 mg/l).

Generalmente, para los propósitos del presente invento un “alimento de hidrolisato” incluye hidrolisatos de trigo y/o soya. Generalmente, un hidrolisato de soya o trigo es el producto de una digesta enzimática de soya o trigo y puede adquirirse comercialmente. Típicamente, el hidrolisato se encuentra en agua grado cultivo celular y es estéril. En una realización del invento, el hidrolisato es una solución stock a 200 g/litro. En una realización del invento, el hidrolisato se

agrega al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 10 g/litro aproximadamente. En una realización del invento, cuando se utiliza cualquiera el nivel 3 o el proceso mejorado, el hidrolisato se agrega al medio de cultivo bien sea inicialmente, antes, o inmediatamente después de la inoculación o 3 días aproximadamente después de la inoculación o cuando la densidad celular viable alcanza más de 1×10^5 células/ml.

“Densidad celular viable” se refiere a la concentración de células en el medio bajo análisis (ej., células/ml) las cuales son viables, ej., capaces de crecimiento y replicación (ej., cuando se utilizan para inocular un medio de cultivo líquido o medio de cultivo sólido) ó capaz de excluir una tinción tal como el azul triptano, eosina o propidio en un ensayo de exclusión de tinciones.

10 Tales ensayos comúnmente se conocen en el estado de la técnica.

Generalmente, para los propósitos del presente invento, un “alimento de vitamina/sal” incluye:

Selenito de sodio *ej.*, a una concentración de aproximadamente 7.13×10^{-4} g/litro

Sulfato de adenina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.0816 g/litro

15 Adenosina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.88 g/litro

Citidina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.88 g/litro

Guanosina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.88 g/litro

Uridina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.88 g/litro

Hipoxantina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.59 g/litro

20 L- citrulina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.63 g/litro

L- ornitina- HCl *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.28 g/litro

Biotina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.014 g/litro

Dinucleotido de flavina adenina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.0025 g/litro

Ácido fólico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.23 g/litro

25 Ácido lipoico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.026 g/litro

Niacina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.57 g/litro

HCl de Piridoxina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.15 g/litro

Riboflavina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.093 g/litro

HCl Tiamina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.8 g/litro

30 Vitamina E *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.0188 g/litro

Vitamina B12 *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.17 g/litro

Cloruro de colina ej., a una concentración de aproximadamente 2.51 g/litro

HCl de Etanolamina ej., a una concentración de aproximadamente 0.22 g/litro

L- inositol ej., a una concentración de aproximadamente 3.66 g/litro

Timidina ej., a una concentración de aproximadamente 0.39 g/litro

5 2HCl Putrescina ej., a una concentración de aproximadamente 0.02 g/litro

Progesterona ej., a una concentración de aproximadamente 0.00075 g/litro; and

Pantotenato de D- calcio ej., a una concentración de aproximadamente 1.19 g/litro

En una realización del invento, el alimento de vitamina/sal es una solución stock 50X. En una realización del invento, el alimento de vitamina/sal se agrega al medio de cultivo para alcanzar

10 una concentración final de 20 ml/litro aproximadamente. Cuando se emplea el nivel 3, el alimento de vitamina/sal se agrega al cultivo entre los días 3 y 5, después de inoculación, o cuando la densidad celular viable alcanza más de 1×10^6 células/ml. En una realización del invento, cuando se emplea el proceso mejorado, el alimento de vitamina/sal se agrega al cultivo entre los días 3 y 5, después de inoculación, o cuando la densidad celular viable alcanza más de

15 1×10^6 células/ml.

Generalmente, para los propósitos del presente invento, un “alimento aminoácido” incluye:

L- Arginina ej., a una concentración de aproximadamente 6.32 g/litro

L- Cistina ej., a una concentración de aproximadamente 1.7 g/litro

20 L- histidina ej., a una concentración de aproximadamente 2.1 g/litro

L- Isoleucina ej., a una concentración de aproximadamente 2.6 g/litro

L- Leucina ej., a una concentración de aproximadamente 2.6 g/litro

L- lisina ej., a una concentración de aproximadamente 3.6 g/litro

L- Metionina ej., a una concentración de aproximadamente 0.76 g/litro

25 L- fenilalanina ej., a una concentración de aproximadamente 1.65 g/litro

L- treonina ej., a una concentración de aproximadamente 2.38 g/litro

L- triptófano ej., a una concentración de aproximadamente 0.51 g/litro

L- tirosina ej., a una concentración de aproximadamente 1.8 g/litro

L- valina ej., a una concentración de aproximadamente 2.34 g/litro

30 L- alanina ej., a una concentración de aproximadamente 0.89 g/litro

L- Asparagina ej., a una concentración de aproximadamente 1.5 g/litro

L- ácido aspártico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.33 g/litro

L- Ácido glutámico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.47 g/litro

Glicina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 0.75 g/litro

L- prolina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.15 g/litro; and

5 L- Serina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 1.05 g/litro

En una realización del invento, dos soluciones concentradas separadas de alimento aminoácido son preparadas: Una solución stock 100X que incluye L- alanina, L- asparagina, L- ácido aspártico, L- ácido glutámico, glicina, L- prolina y L- serina a las concentraciones divulgadas anteriormente; y una solución 50X que incluye L- arginina, L- cistina, L- histidina, L- isoleucina, L- leucina, L- lisina, L- metionina, L- fenilalanina, L- treonina, L- triptófano, L- tirosina, y L- valina a las concentraciones divulgadas anteriormente. Estas concentraciones pueden prepararse y agregarse de manera separada al medio de cultivo. En una realización del invento, la solución stock aminoácida se agrega al medio inicial en día 0, antes, o inmediatamente después de inoculación celular.

15 Generalmente, para los propósitos del presente invento, un “alimento nutriente” incluye:

L- Asparagina: *ej.*, a una concentración de aproximadamente 40.6 g/litro

L- prolina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 10.81

L- Isoleucina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 18.53

L- cisteína- HCl *ej.*, a una concentración de aproximadamente 11.19

20 L- Leucina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 16.58

L- treonina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 8.2

L- tirosina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 9.9

L- Arginina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 9.29

L- ácido aspártico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 3.56

25 L- Ácido glutámico *ej.*, a una concentración de aproximadamente 6.28

Glicina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 2.83

L- histidina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 6.23

L- metionina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 6.58

L- triptófano *ej.*, a una concentración de aproximadamente 4.93

30 L- lisina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 14.66

L- fenilalanina *ej.*, a una concentración de aproximadamente 8.64

93

L- valina ej., a una concentración de aproximadamente 13.08 g/litro

L- Serina: ej., a una concentración de aproximadamente 13 g/litro

Sulfato sódico monobásico: ej., a una concentración de aproximadamente 14.41 g/litro

Sulfato de zinc: ej., a una concentración de aproximadamente 0.054 g/litro

5 Sulfato cúprico: ej., a una concentración de aproximadamente 0.00016 g/litro

Vanadato de amonio: ej., a una concentración de aproximadamente 0.000039 g/litro

Cloruro de cobalto: ej., a una concentración de aproximadamente 0.000125 g/litro

Dicloruro hexahidrato de níquel: ej., a una concentración de aproximadamente 0.00002 g/litro

Molibdato dehidrato sódico: ej., a una concentración de aproximadamente 0.000008 g/litro

10 Cloruro dehidrato de estaño: ej., a una concentración de aproximadamente 0.000004 g/litro

Cloruro de manganeso: tetrahidrato: ej., a una concentración de aproximadamente 0.000015 g/litro. En una realización del invento, el alimento nutriente es una solución stock 50X.

En una realización del invento, el alimento nutriente se agrega al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 20 ml/litro aproximadamente. Cuando se emplea el proceso mejorado, el alimento nutriente se agrega al cultivo entre los días 3 y 5, después de inoculación, o cuando la densidad celular viable alcanza más de 1×10^6 células/ml.

Además, en una realización del invento, cuando se emplea uno u otro el nivel 3 o el proceso mejorado, glucosa (desde una solución stock 2.5 M) y L- glutamina (desde una solución stock 0.2 M) se agregan al medio de cultivo en cualquier punto, ej., cuando la concentración de los nutrientes cae por debajo de 1.5 g/litro de glucosa y 150 mg/litro de L- glutamina.

Cambio de osmolalidad y temperatura

El presente invento también incluye procesos en donde la osmolalidad y/o la temperatura del cultivo opcionalmente son cambiadas. El cambio en osmolalidad o temperatura puede realizarse en cualquier punto en el proceso.

El cambio de osmolalidad ha sido mostrado por aumentar la productividad específica del cultivo así como también la viabilidad celular. Típicamente, el medio de crecimiento celular mamífero inicial tiene una osmolalidad de inicio de 300 mOsm aproximadamente. Sin embargo, el “cambio de osmolalidad” del presente invento, incluye cambiar la osmolalidad del cultivo desde 400 mOsm aproximadamente a 500 mOsm aproximadamente.

La osmolalidad es una medida de los osmoles de soluto por kilogramo de solvente. La osmolalidad puede medirse utilizando un osmómetro el cual mide las propiedades coligativas, tales como el descenso crioscópico, presión de vapor, ó elevación del punto de ebullición. La osmolalidad de un cultivo celular puede cambiarse mediante cualquier de varios medios. Por ejemplo, un solución de sal concentrada (ej., incluyendo stock de sal 5M NaCl, añadiendo 8- 12 mL/L), solución de hidrolisato de soya (stock de 200 g/L, añadiendo 50- 80 mL/L), o dióxido de carbono, pueden agregarse. En una realización del invento, agregar el alimento nutriente al medio cambia la osmolalidad.

En una realización del invento, la temperatura del cultivo es opcionalmente cambiada, ej., en un cambio gradual, desde 36.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) a entre 33°C y 35°C aproximadamente.

Proteínas

El presente invento incluye realizaciones que comprenden métodos para la producción recombinante de proteínas tales como cadenas de inmunoglobulina. En una realización del invento, la inmunoglobulina comprende un anticuerpo anti- IGF1 R (ej., anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico) ó fragmento fijador de antígenos de los mismos, ej., incluyendo una región variable de cadena liviana de inmunoglobulina y/o de cadena pesada, opcionalmente enlazada con una región constante de inmunoglobulina.

Por ejemplo, el presente invento incluye métodos en donde una proteína a ser expresada (ej., una inmunoglobulina anti- IGF1R de cadena liviana o cadena pesada) es codificada por un polinucleótido en una vector plásmido, ej., en donde el polinucleótido es operablemente enlazado a un promotor tal como un promotor CMV. En una realización del invento, las cadenas liviana y pesada son incluidas en un único vector plásmido.

En una realización del invento, la cadena de inmunoglobulina codifica cualquiera de las divulgadas a continuación; por ejemplo, cualquiera de las cadenas liviana y/o pesada de inmunoglobulina y/o cualquiera de las CDRs de las mismas (ej., todas las 3 desde una única cadena liviana o pesada). El tipo punteado, subrayado codifica el péptido señal. El tipo subrayado sólido codifica las CDRs. El tipo plano codifica las regiones marco. En una realización del invento, las reivindicaciones se expresan con el péptido señal el cual es escindido ante secreción a partir de la célula huésped para generar un fragmento maduro de la cadena.

Las composiciones y procesos para producir cualquiera de las secuencias aminoácidas de inmunoglobulina diana o fragmentos maduros de las mismas forman parte del presente invento.

Cadena liviana 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 1)

MSPSQLIGFLLLWVPASRGEIVLTQVPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD
QSPKLLIKYASQSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYCHQSSRLPHTFGGG

5 TKVEIKRT

Cadena Pesada 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 2)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAP
GKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARLGNF
YYGMDVWGQGTTTTVSS

Cadena liviana C (LCC) 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 3)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
G E R V T I T C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
S G T D F T L T I S S L E A E D A
A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

10

Cadena liviana D (LCD) 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 4)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P D S L S V T P
G E R V T I T C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K
Y A S Q S L S G V P S R F S G S G
S G T D F T L T I S S L E A E D F
A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

19D12/15H12 Light Chain- E (LCE) (SEQ ID NO: 5)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P G T L S V S P
G E R A T L S C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
S G T D F T L T I S R L E P E D A

A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

5 Cadena liviana F (LCF) 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 6)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S
R G E I V L T Q S P G T L S V S P
G E R A T L S C R A S Q S I G S S
L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K
Y A S Q S L S G I P D R F S G S G
S G T D F T L T I S R L E P E D F
A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q
G T K V E I K R T

Cadena pesada- A (HCA) 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 7)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val
Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn
Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

Cadena pesada- B (HCB) 19D12/15H12 (SEQ ID NO: 8)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val
Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn
Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser

Ver solicitud de publicación internacional No. 2003/100008 la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

5 Cadena liviana 2C6

MELGLSWIFLLAILKGVQC
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSKGYVDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDIRIGVAASYFFGMDVWGHGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)

- 2C6 CDR-H1: GFTFDDYAMH (SEQ ID NO: 10)
- 2C6 CDR-H2: GISWNSGSKGYVDSVKG (SEQ ID NO: 11)
- 2C6 CDR-H3: DIRIGVAASYFFGMDV (SEQ ID NO: 12)

CADENA LIVIANA 2C6

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC
AIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSVLAWYQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)

- 2C6 CDR-L1: RASQGISSVLA (SEQ ID NO: 14)
- 2C6 CDR-L2: DASSLES (SEQ ID NO: 15)
- 2C6 CDR-L3: QQFNSYPYT (SEQ ID NO: 16)

10 Cadena Pesada 9H2

MDWTWRILFLVAAATGAHS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGW**WINAGNGNTKYSQKFQG**GRVTITRDTAS
TVYMEISSLRSEDTAVYYCARG**GGMPVAGPGYFYYYGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)

9H2 CDR-H1: GYTFTSYVMH (SEQ ID NO: 18)
9H2 CDR-H2: WINAGNGNTKYSQKFQG (SEQ ID NO: 19)
9H2 CDR-H3: GGMPVAGPGYFYYYGMDV (SEQ ID NO: 20)

Cadena Liviana 9H2

METPAQLFLFLLLWLPDTTG
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC**RASQSVSRSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFLTIS
RLEPEDFAVYCC**QQYGSSPWT**FGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 21)

9H2 CDR-L1: RASQSVSRSYLA (SEQ ID NO: 22)
9H2 CDR-L2: GASSRAT (SEQ ID NO: 23)
9H2 CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 24)

5

Secuencia de región variable de inmunoglobulina de cadena pesada #1.0

E VQLLESQGGGL VQPGGSLRLS CTASGFTFSS YAMNWVRQAP GKGLEWVSAI SGSGGTTFYA
DSVKGRFTIS RDNSRTTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDLG WSDSYYYYYG MDVWGQGTTV
TVSS (SEQ ID NO: 25);

Secuencia de región variable de inmunoglobulina de cadena liviana #1.0

DIQMTQFP SLSASVGDR VTITCRASQG IRNDLGWYQQ KPGKAPKRLI YAASRLHRGV
PSRFSGSGSG TEFTLTISL QPEDFATYYC LQHNSYPCSF GQGTKLEIKR (SEQ ID NO:
26);

10 Las realizaciones del invento incluyen aquellas en donde la inmunoglobulina se expresa, por ejemplo, en combinación de cualquiera de aquellas divulgadas en la presente (ej., Inmunoglobulina de cadena pesada # 1.0 e inmunoglobulina de cadena liviana #1.0; o LCC y HCA; o LCF y HCA; o LCC y HCB). El corresponder cadenas livianas con pesada puede resultar en la generación de un fragmento fijador de anticuerpos o antígenos de las mismas.

En una realización del invento, la cadena liviana es condensada a una cadena constante de inmunoglobulina, ej., una cadena kappa. En una realización del invento, la cadena pesada es condensada a una cadena constante de inmunoglobulina, ej., una cadena gama- 1, gama- 2, gama3 o gama- 4.

- 5 Otras proteínas de interés que pueden expresarse utilizando los métodos y composiciones del presente invento incluyen receptores, ligandos, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, hormonas y enzimas.

Proceso y materiales de producción

- 10 Vectores, tales como plásmidos, incluyendo un gen a ser expresado mediante un proceso del presente invento pueden introducirse en una célula huésped mediante cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. La transformación puede realizarse, ej., mediante el método de precipitación de fosfato de calcio como se describió por Graham y Van der Eb, Virología, 52: 546 (1978). Pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células tales como inyección nuclear o mediante fusión de protoplasto. Los métodos para transformación también incluyen electroporación, transformación liposomal y transformación DEAE- Dextrana.

- 15 Las células huésped son, en una realización del invento, células mamíferas. Por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (células CHO). Una célula CHO- K1 requiere prolina y es diploide para el gen de reductasa de dihidrofolato [dhfr]. En una realización del invento, la línea celular es la línea DXBH CHO (Urlaub (1983) Cell 33:405- 12). Otras líneas celulares incluyen, por ejemplo, HEK293.

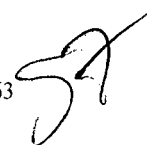
- 20 Las células huésped que comprenden un gen a ser expresado utilizando un proceso del presente invento pueden seleccionarse y clasificarse para identificar el clon con las características requisito para la expresión de un gen diana. En células de ovario de hámster chino (CHO), en enfoque común para lograr la máxima expresión, involucra el uso de líneas celulares mutantes y un aumento gradual en la presión de selección durante varios meses para un marcador de selección co- transfectado tal como reductasa de dihidrofolato (DHFR) (Kaufman (1982) J. Mol. Biol. 159: 601- 621; Schimke. (1982) Natl. Cancer Inst. Monogr. 60: 79- 86). Con el objeto de lograr altas tasas de producción, una línea celular negativa de reductasa de dehidrofolato (DHFR) (ej., una línea celular CHO) (Urlaub (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216- 4220) es transformada con un vector de expresión que contiene un gen *DHFR*

- 30

funcional en combinación con el gen diana a ser expresado. La amplificación de los genes diana insertados por vector ocurre en respuesta a la adición de cantidades crecientes de metotrexato (MTX), un antagonista de la DHFR, al medio de cultivo y clones o subpoblaciones que llevan múltiples copias de los genes recombinantes se generan y pueden seleccionarse (Wurm (1990) Biologicals 18:159164). El proceso de amplificación genética típicamente toma varios meses hasta que se obtienen líneas celulares estables las cuales muestran altos números de copias de genes diana y altas tasas de producción de la proteína deseada.

En una realización del invento, un polinucleótido del presente invento es integrado en una célula huésped (por ejemplo, CHO, CHO- K1, CHO DXB11), ADN cromosómico o ADN ectópico o de replicación autónoma. En una realización del invento, el polinucleótido del presente invento está presente en la célula en varias copias por célula (ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20). Donde un vector de expresión se ha integrado en el ADN genómico de la célula hospedera para mejorar estabilidad, el número de copias del vector de ADN, y, concomitantemente, la cantidad de producto que podría expresarse, pueden aumentarse al seleccionar líneas celulares en las cuales las secuencias de vector se han amplificado después de integración en el ADN de la célula hospedera. Genes integrados pueden clasificarse para la presencia y cantidad relativa de ADN cromosómicamente incorporado y ARNm correspondiente y síntesis de polipéptidos mediante métodos estándares. Por ejemplo, la presencia del integrado deseado puede detectarse mediante procedimientos estándares tales como secuenciamiento de ADN, Southern blotting, Northern blotting y/o Western blotting.

Cualquiera de los diferentes medios de cultivo celular en el estado de la técnica pueden utilizarse para propagar células que expresan un gen diana. Varios medios de cultivo comercialmente disponibles están disponibles. Si se expresa una proteína a ser utilizada terapéuticamente, pueden ser deseables medios libres de productos animales (ej., medios libres de suero (SFM)). Existen varios métodos conocidos en el estado de la técnica mediante los cuales las células pueden adaptarse a crecimiento en medio libre de suero. Por ejemplo, la adaptación directa incluye el mero intercambio de células entre medios suplementados con suero a medios libres de suero. La adaptación secuencial o separación incluye células de conmutación desde medio suplementado con suero en un medio libre de suero en varios pasos (ej., SFM 25%, SFM 50%, SFM 75%, luego, SFM 90% durante 3 pases aproximadamente, luego SFM 100%). La adaptación secuencial tiende a ser menos severa sobre células que la adaptación directa.



Generalmente, para adaptar células a medios libres de suero, el cultivo debe estar en una fase logarítmica suave, >90% viable y debe sembrarse a una inoculación celular inicial mayor que durante adaptación directa. En una realización del invento, el medio de crecimiento celular mamífero inicial es medio EX- CELL ACF CHO el cual es comercialmente disponible en

5 Sigma- Aldrich (St.Louis, MO). Este cultivo es libre de componente animal, con HEPES (ácido N- 2- hidroxietilpiperazina- N'- 2- etansulfónico), no contiene L- glutamina, es líquido, filtrado de manera estéril y probado para cultivos celulares. El medio también incluye sales inorgánicas, buffers de bicarbonato de sodio, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, insulina humana recombinante, hidrolisatos vegetales, otros compuestos orgánicos, elementos traza, y
10 surfactantes. El medio tampoco contiene antibióticos, antimicóticos o transferina y tampoco contiene proteínas de origen animal u otros componentes. Típicamente, para reconstitución del medio, un médico debe agregar de manera aséptica 20- 40 ml de 200 mM L- solución de glutamina por litro de medio antes de utilizar.

Una línea celular que contiene una célula hospedera que comprende un gen a ser
15 expresado utilizando un proceso del presente invento también puede almacenarse en un banco celular maestro (MCB) y/o banco celular de trabajo (WCB) Típicamente, cuando una línea celular se va a utilizar sobre muchos ciclos de fabricación, puede establecerse un sistema de bancos celulares de dos etapas consistente en un banco celular maestro o banco de siembra maestro (MSB) y un banco celular de trabajo Una línea celular es establecida a partir de un único
20 clon de célula huésped y esta línea celular se utiliza para construir el MCB. Generalmente, este MCB debe caracterizarse y probarse ampliamente para contaminantes tales como bacterias, hongos, virus y micoplasma. Una muestra de células desde el MCB puede expandirse para formar el WCB, el cual se caracteriza por viabilidad celular antes de utilizar en un proceso de fabricación. Las células en un MCB o WCB pueden almacenarse en viales, por ejemplo, a baja
25 temperatura (ej., 0°C o menos, - 20°C o - 80°C).

Típicamente, el banco celular de trabajo incluye células desde un vial del banco maestro las cuales han sido cultivadas durante varios pases de cultivo o de siembra antes de
almacenamiento. En general, cuando las células futuras son necesarias, estas son tomadas desde el banco celular de trabajo; mientras, el banco celular maestro se utiliza solamente cuando es
30 necesario, asegurando una concentración de células con un número bajo de pases para evitar variación genética dentro del cultivo celular.

El presente invento proporciona dos procesos para cultivar células y producir de manera recombinante una proteína – el proceso “nivel 3” y el “proceso mejorado”. Ambos procesos generan altos niveles de proteínas de interés, sin embargo el proceso mejorado genera niveles especialmente altos.

En una realización del invento, el nivel 3 para producir una proteína, tal como un anticuerpo (ej., anti- IGF1 R) comprende los pasos:
1- expandir células que expresan la proteína en un medio crecimiento mamífero inicial estándar (ej., medio CHO Sigma con L- glutamina agregada (4 mM)).

Esta expansión puede realizarse, por ejemplo, en matraces de agitación. En una realización del invento, la expansión ocurre mediante un crecimiento hasta $1-2 \times 10^6$ células/ml, dilución de una muestra estas células (ej., a una densidad de $2.5-5 \times 10^5$ células/ml) y luego, cultivar nuevamente a $1-2 \times 10^5$ células/ml, durante 1—30 pases de cultivo o de siembra.
2- inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial con las células expandidas desde el paso (1), a una densidad celular de $2.5-5 \times 10^5$ células/ml, y agregar suplementos al medio. Los suplementos son hidrolisato de trigo y/o soya, alimento aminoácido, alimento de vitamina/sal, glucosa y L- glutamina.

El día de inoculación es “día 0”, el siguiente día es “día 1”, el siguiente día es “día 2”, y así sucesivamente.

Hidrolisatos de soya o trigo se agregan, por ejemplo, bien sea el día 0 o después que la densidad celular viable ha alcanzado 10^6 células/ml aproximadamente. En una realización del invento, el hidrolisato o hidrolisatos son simplemente agregados el día 3 cuando la densidad celular viable alcanza 10^6 células/ml.

Los alimentos aminoácidos (discutidos anteriormente) se agregan, por ejemplo, el día 0, ej., para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se divulga más adelante (sin incluir la concentración de cualquier componente indicado desde fuentes tales como el medio de crecimiento celular mamífero inicial):

<u>Componente</u>	<u>Concentración final en cultivo (mg/litro)</u>
L- Arginina	126.4
L- Cistina	34
L- histidina	42
L- Isoleucina	52

	L- Leucina	52
	L- Lisina	72
	L- Metionina	15.2
	L- fenilalanina	33
5	L- treonina	47.6
	L- triptófano	10.2
	L- tirosina	36
	L- valina	46.8
	L- alanine	8.9
10	L- Asparagina	30
	L- ácido aspártico	26.6
	L- Ácido glutámico	29.4
	Glicina	15
	L- prolina	23
15	L- Serina	21

En una realización del invento, los alimentos aminoácidos no se agregan al medio.

La solución de alimento de vitamina/sal (discutida anteriormente) se agrega, por ejemplo, entre los días 3 y 5 ó cuando la densidad celular viable alcanza 10^6 células/ml, ej., para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se divulga más adelante (sin incluir la concentración de cualquier componente indicado desde otras fuentes tales como desde el medio de crecimiento celular mamífero inicial):

	<u>Componente</u>	<u>Concentraciones finales de cultivo (mg/litro)</u>
	Selenito de sodio	0.01426
	Sulfato de adenina	1.632
25	Adenosina	17.6
	Citidina	17.6
	Guanosina	17.6
	Uridina	17.6
	Hipoxantina	11.8
30	L- citrulina	12.6
	L- ornitina- HCl	25.6

	Biotina	0.28
	Dinucleotido de flavina adenina	0.05
	Ácido fólico	4.6
	Ácido lipoico	0.52
5	Niacina	31.4
	HCl de Piridoxina	3
	Riboflavina	1.86
	HCl Tiamina	16
	Vitamina E	0.376
10	Vitamina B12	3.4
	Cloruro de colina	50.2
	Etanolamina HCl	4.4
	L- Inositol	73.2
	Timidina	7.8
15	2HCl Putrescina	0.4
	Progesterona	0.015
	Pantotenato de D- calcio	23.8

Se agrega glucosa, por ejemplo, cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo cae por debajo de 1.5 g/litro aproximadamente y se agregó L- Glutamina, por ejemplo, cuando la concentración de Glutamina en el medio de cultivo cae por debajo de 150 mg/litro.

3- Opcionalmente cosechar las células desde el medio de cultivo celular de producción, ej., cuando la viabilidad está por debajo de 60%, al retirar las células desde el medio de cultivo (ej., al reducir la temperatura de las células a 15°C, agregando buffer de fosfato de sodio para estabilizar el pH en 6.8 aproximadamente y centrifugar el medio de cultivo para clarificarlo de células). Si la proteína es secretada, el medio puede retenerse para procesamiento adicional, si la proteína no es secretada, las células pueden ser retenidas para procesamiento adicional.

Cualquiera de varios métodos pueden utilizarse para retirar las células desde el medio, ej., mediante centrifugación. Por ejemplo, utilizando una centrifugadora continua de disco apilado, ej., con una tasa de flujo/sigma (cm/seg) de aproximadamente 9.27×10^{-7} .



Además, el medio puede filtrarse para retirar células, ej., mediante filtración en profundidad con o sin una centrifuga. Por ejemplo, con una centrifuga, en una realización del invento, el proceso puede comprender el uso de filtro de 8 ± 2 L caldo/ft² (ej., filtro de celulosa cargado); sin una centrifuga, el proceso puede, en una realización del invento, comprender el uso de un 20 ± 3 L caldo/pie² filtro.

Además, el medio puede filtrarse a través de un filtro fino, por ejemplo, con un tamaño de poro de 0.2 micras (ej., un filtro PVDF), y;

4- Opcionalmente purificar adicionalmente la proteína, ej., anticuerpo, por ejemplo, cromatográficamente.

En una realización del invento, el proceso mejorado para producir una proteína, tal como un anticuerpo (ej., anti- IGF1 R) comprende los pasos:

1- expandir células que expresan la proteína en un medio de crecimiento mamífero inicial estándar.

Esta expansión puede realizarse, por ejemplo, en matraces de agitación. En una realización del invento, la expansión ocurre al cultivar a $1-2 \times 10^6$ células/ml, dilución de una muestra de estas células (ej., a una densidad de $2.5-5 \times 10^5$ células/ml) y luego, cultivar nuevamente a $1-2 \times 10^6$ células/ml, durante 10- 30 pases.

2- inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial con las células expandidas, a una densidad celular de $2.5-5 \times 10^5$ células/ml, y agregar suplementos al medio. Los suplementos son hidrolisato de trigo y/o soya, alimento aminoácido, alimento de vitamina/sal, glucosa y L- glutamina.

El día de inoculación es “día 0”, el siguiente día es el “día 1”, el siguiente día es el “día 2”, y así sucesivamente.

Hidrolisatos de soya o trigo se agregan, por ejemplo, bien sea el día 0 o después que la densidad celular viable ha alcanzado 10^6 células/ml aproximadamente. En una realización del invento, el hidrolisato o hidrolisatos simplemente se agregan el día 3.

Los alimentos aminoácidos (discutidos anteriormente) se agregan, por ejemplo, el día 0, ej., para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se divulga más adelante (sin incluir la concentración de cualquier componente indicado desde otras fuentes tales como el medio de crecimiento celular mamífero inicial):

<u>Componente</u>	<u>Concentración final in culture (mg/litro)</u>
-------------------	--

	L- Arginina	126.4
	L- Cistina	34
	L- histidina	42
	L- Isoleucina	52
5	L- Leucina	52
	L- lisina	72
	L- Metionina	15.2
	L- fenilalanina	33
	L- treonina	47.6
10	L- triptófano	10.2
	L- tirosina	36
	L- valina	46.8
	L- alanine	8.9
	L- Asparagina	30
15	L- ácido aspártico	26.6
	L- Ácido glutámico	29.4
	Glicina	15
	L- prolina	23
	L- Serina	21

20 En una realización del invento, los alimentos aminoácidos no se agregan al medio. La solución alimento de vitamina/sal (discutida anteriormente) se agrega, por ejemplo, entre los días 3 y 5 o cuando la densidad celular viable alcanza 10⁶ células/ml, ej., para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se divulga más adelante (sin incluir la concentración de cualquier componente indicado desde otras fuentes tales como desde el medio de crecimiento celular mamífero inicial):

	<u>Componente</u>	<u>Concentraciones finales de cultivo (mg/litro)</u>
	Selenito de sodio	0.01426
	Sulfato de adenina	1.632
	Adenosina	17.6
30	Citidina	17.6
	Guanosina	17.6

	Uridina	17.6
	Hipoxantina	11.8
	L- citrulina	12.6
	L- ornitina- HCl	25.6
5	Biotina	0.28
	Dinucleotido de flavina adenina	0.05
	Ácido fólico	4.6
	ácido lipóico	0.52
	Niacina	31.4
10	HCl de Piridoxina	3
	Riboflavina	1.86
	HCl Tiamina	16
	Vitamina E	0.376
	Vitamina B12	3.4
15	Cloruro de colina	50.2
	Etanolamina HCl	4.4
	L- Inositol	73.2
	Timidina	7.8
	2HCl de Putrescina	0.4
20	Progesterona	0.015
	Pantotenato de D- calcio	23.8

Algunos componentes del alimento de vitamina/sal también están en otros alimentos tal como el alimento aminoácido. Estas concentraciones finales de cultivo son de los componentes desde el alimento de vitamina/sal y no reflejan las concentraciones acumulativas de los componentes indicados desde ambos el alimento aminoácido y el alimento de vitamina/sal.

El alimento nutriente (discutido anteriormente) se agrega, por ejemplo, entre los días 3 y 5 o cuando la densidad celular viable alcanza 10^6 células/ml, ej., para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se divulga más adelante (sin incluir la concentración de cualquier componente indicado desde otras fuentes tales como desde el medio de crecimiento celular mamífero inicial o alimento aminoácido):

<u>Componente</u>	<u>Concentración final de cultivo(mg/litro)</u>
-------------------	---

	L- Asparagina:	812 mg/litro
	L- prolina	216 mg/litro
	L- Isoleucina	370 mg/litro
	L- cisteina- HCl	224 mg/litro
5	L- Leucina	332 mg/litro
	L- treonina	164 mg/litro
	L- tirosina	198 mg/litro
	L- Arginina	186 mg/litro
	L- ácido aspártico	71 mg/litro
10	L- Ácido glutámico	126 mg/litro
	Glicina	57 mg/litro
	L- histidina	125 mg/litro
	L- metionina	132 mg/litro
	L- triptófano	99 mg/litro
15	L- lisina	293 mg/litro
	L- fenilalanina	174 mg/litro
	L- valina	262 mg/litro
	L- Serina:	260 mg/litro
	Sulfato sódico monobásico:	288.2 mg/litro
20	Sulfato de zinc:	1.08 mg/litro
	Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
	Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
	Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
	Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro
25	Molibdato dehidrato sódico:	0.00016 mg/litro
	Cloruro dehidrato de estaño:	0.00008 mg/litro
	Cloruro de manganeso tetrahidrato:	0.0003 mg/litro

Algunos componentes del alimento nutriente están también en otros alimentos tales como el alimento aminoácido. Estas concentraciones finales de cultivo son de los componentes desde el alimento nutriente y no reflejan las concentraciones acumulativas de los componentes indicados desde ambos el alimento aminoácido y el alimento nutriente.

61

La glucosa se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo cae por debajo de 1.5 g/litro y L- glutamina se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glutamina en el medio de cultivo cae por debajo de 150 mg/litro. 3- Opcionalmente cosechar las células desde el medio de cultivo celular de producción, ej., cuando la viabilidad está por debajo de 60%, al retirar las células desde el medio de cultivo (ej., al reducir la temperatura de las células a 15°C, agregando buffer de fosfato de sodio para estabilizar el pH en 6.8 aproximadamente y centrifugar el medio de cultivo para clarificarlo de células). Si la proteína es secretada, el medio puede retenerse para procesamiento adicional, si la proteína no es secretada, las células pueden ser retenidas para procesamiento adicional.

Cualquiera de varios métodos pueden utilizarse para retirar las células desde el medio, ej., mediante centrifugación. Por ejemplo, utilizando una centrifugadora continua de disco apilado, ej., con una tasa de flujo/sigma (cm/seg) de aproximadamente 9.27×10^{-7} .

Además, el medio puede filtrarse para retirar células, ej., mediante filtración en profundidad con o sin una centrifuga. Por ejemplo, con una centrifuga, en una realización del invento, el proceso puede comprender el uso de filtro de $8 \pm \pm 2$ L caldo/ft² (ej., filtro de celulosa cargado); sin una centrifuga, el proceso puede, en una realización del invento, comprender el uso de un 20 ± 3 L caldo/ft² del filtro.

Además, el medio puede filtrarse a través de un filtro fino, por ejemplo, con un tamaño de poro de 0,2 micras (ej., un filtro PVDF), y;

4- Opcionalmente purificar adicionalmente la proteína, ej., anticuerpo, por ejemplo, cromatográficamente.

Opcionalmente, cuando se utiliza el nivel 3 o proceso mejorado, la osmolalidad del cultivo se cambia de 400 mOsm a 500 mOsm aproximadamente (como se discutió anteriormente). En una realización del invento, este cambio ocurre cuando las células están a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Opcionalmente, cuando se utiliza el nivel 3 o proceso mejorado, la temperatura del cultivo se cambia de 33 °C a 35 °C aproximadamente (como se discutió anteriormente). En una realización del invento, este cambio ocurre, en una realización del invento, entre los días 4 y 8, ej., cuando el cambio en densidad celular viable durante un periodo de 24 horas es menor del 10%.

En una realización del invento, cuando se utiliza uno u otro el nivel 3 o proceso mejorado, la concentración de O₂ del cultivo celular, las condiciones de pH y temperatura son continuamente monitoreadas y ajustadas durante crecimiento celular. En una realización del invento, la concentración de O₂ es monitoreada y mantenida en 60% aproximadamente durante el crecimiento celular; y/o el pH es continuamente monitoreado y mantenido en 6.8 aproximadamente (ej., ± 0.02) durante crecimiento celular; y/o la temperatura es continuamente monitoreada y mantenida en 36.5°C (ej., ± 0.5 °C) aproximadamente) durante crecimiento celular.

El crecimiento celular puede realizar en cualquiera de varios sistemas. Por ejemplo, el crecimiento celular puede realizarse en un matraz simple, ej., una matraz de agitación de vidrio. Otros sistemas incluyen biorreactores de tipo tanque, biorreactores de bolsa y biorreactores desechables. Un biorreactor de tanque incluye, típicamente, un recipiente metálico (ej., un recipiente revestido de acero inoxidable) en el cual las células son cultivadas en un medio líquido. Los biorreactores de tipo tanque pueden utilizarse para un rango amplio de volúmenes de cultivo (ej., 100 I, 150 I, 10000 I, 15000 I). Los biorreactores de tipo tanque tienen características adicionales para controlar condiciones de crecimiento celular, incluyendo medios para control de temperatura, agitación de medio, control de concentraciones de gas de barboteo, controlar pH, controlar concentración de O₂, retirar muestras desde el medio, indicación y control de peso del reactor, limpiar hardware, esterilizar el hardware, tubería para liberar todos los servicios, agregar medios, pH de control, soluciones de control, y gases de control, bombear fluidos estériles en el recipiente de crecimiento y, control de supervisión y adquisición de datos. Las clasificaciones de biorreactor de tanque incluyen reactores de tanque agitado en donde agitadores mecánicos (ej., impulsores) se utilizan para mezclar el reactor para distribuir calor y materiales (tales como oxígeno y sustratos). Los reactores de columna de burbujas son reactores altos que utilizan solo aire para mezclar los contenidos. Los reactores de elevación con aire son similares a reactores de columna de burbujas, pero difieren por el hecho que contienen un tubo de aspiración. El tubo de aspiración típicamente es un tubo interno el cual mejora la circulación y transferencia de oxígeno e igual las fuerzas de corte en el reactor. En reactores de lecho fluidizado, las células son “inmovilizadas” sobre partículas pequeñas las cuales se mueven con el fluido. Las partículas pequeñas crean un área de superficie grande para que las células se adhieran y permitan una alta tasa de transferencia de oxígeno y nutrientes hacia las células. En

reactores de lecho empacado las células son inmovilizadas sobre partículas grandes. Estas partículas no se mueven con el líquido. Los reactores de lecho empacado son simples de construir y operar pero pueden sufrir de bloqueos y de pobre transferencia de oxígeno. Un biorreactor desechable es un biorreactor que se utiliza una sola vez. A menudo, los biorreactores desechables poseen características similares a biorreactores no desechables (ej., sistema de agitación, atomización, sondas, puertos, etc.).

El presente invento además incluye cualquier medio de cultivo líquido generado mediante cualquiera de los procesos divulgados en la presente; producido mediante un proceso que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial, pre- calentado a 37°C; tal medio comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y el cual no comprende L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con células huésped CHO DXB11 que expresan la inmunoglobulina de cadena liviana e inmunoglobulina de cadena pesada de anticuerpos, a una densidad celular de 2.5- 5 X 10⁵ células/ml aproximadamente; y agregando los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente o inmediatamente después de dicha inoculación: Hidrolisato de soya a una concentración final de 10 g/litro aproximadamente; y, opcionalmente, un alimento aminoácido en donde la concentración de los componentes agregados por dicho alimento aminoácido son aproximadamente aquellos divulgados a continuación.

L- Arginina:	126.4 mg/litro
L- Cistina:	34 mg/litro
L- histidina:	42 mg/litro
L- Isoleucina:	52 mg/litro
L- Leucina:	52 mg/litro
L- lisina:	72 mg/litro
L- Metionina:	15.2 mg/litro
L- fenilalanina:	33 mg/litro
L- treonina:	47.6 mg/litro
L- triptófano:	10.2 mg/litro
L- tirosina:	36 mg/litro

	L- valina:	46.8 mg/litro
	L- alanine:	8.9 mg/litro
	L- Asparagina:	30 mg/litro
	L- ácido aspártico:	26.6 mg/litro
5	L- Ácido glutámico:	29.4 mg/litro
	Glicina:	15 mg/litro
	L- prolina:	23 mg/litro
	L- Serina:	21 mg/litro
; y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1.2×10^6 células/ml		
10	aproximadamente, agregar alimentos suplementarios en donde las concentraciones de los componentes agregados por dichos alimentos suplementarios son aproximadamente aquellas divulgadas a continuación.	
	Selenito de sodio:	0.01426 mg/litro
	Sulfato de adenina:	1.632 mg/litro
15	Adenosina:	17.6 mg/litro
	Citidina:	17.6 mg/litro
	Guanosina:	17.6 mg/litro
	Uridina:	17.6 mg/litro
	Hipoxantina:	11.8 mg/litro
20	L- citrulina:	12.6 mg/litro
	L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
	Biotina:	0.28 mg/litro
	Dinucleotido de flavina adenina:	0.05 mg/litro
	Ácido fólico:	4.6 mg/litro
25	Ácido lipoico:	0.52 mg/litro
	Niacina:	31.4 mg/litro
	HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
	Riboflavina:	1.86 mg/litro
	HCl de Tiamina:	16 mg/litro
30	Vitamina E:	0.376 mg/litro
	Vitamina B12:	3.4 mg/litro

	Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
	HCl de etanolamina:	4.4 mg/litro
	L- Inositol:	73.2 mg/litro
	Timidina:	7.8 mg/litro
5	2HCl Putrescina :	0.4 mg/litro
	Progesterona:	0.015 mg/litro
	Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
	L- Asparagina:	812 mg/litro
	L- prolina	216 mg/litro
10	L- Isoleucina	370 mg/litro
	L- cisteina- HCl	224 mg/litro
	L- Leucina	332 mg/litro
	L- treonina	164 mg/litro
	L- tirosina	198 mg/litro
15	L- Arginina	186 mg/litro
	L- ácido aspártico	71 mg/litro
	L- Ácido glutámico	126 mg/litro
	Glicina	57 mg/litro
	L- histidina	125 mg/litro
20	L- metionina	132 mg/litro
	L- triptófano	99 mg/litro
	L- lisina	293 mg/litro
	L- fenilalanina	174 mg/litro
	L- valina	262 mg/litro
25	L- Serina:	260 mg/litro
	Sulfato sódico monobásico:	288.2 mg/litro
	Sulfato de zinc:	1.08 mg/litro
	Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
	Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
30	Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
	Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro

Molibdato dehidrato sódico: 0.00016 mg/litro

; y, durante el crecimiento celular, agregar glucosa al medio cuando los niveles de glucosa caen por debajo de

1.5 g/litro aproximadamente y agregar L- glutamina cuando los niveles de L- glutamina caen por debajo de 150Mg/litro; y durante crecimiento celular mantener la concentración de O₂ en 60% aproximadamente; pH en 6.8 ± 0.02 y la temperatura en 36.5°C ± 0.5°C; por ejemplo, en donde el medio comprende células que han alcanzado viabilidad de 60%.

Ejemplos

La siguiente información se proporciona para describir de manera más clara el presente invento y no se debe considerar como limitante del presente invento. Cualquiera y todas las composiciones y métodos descritos a continuación, enteramente o en parte, caen dentro del alcance del presente invento.

Ejemplo 1: Expresión de anti- IGF1R utilizando el nivel 3 y proceso mejorado

Se realizaron varias corridas utilizando el proceso mejorado y el nivel 3. En estas corridas, se cultivaron las células CHO DXB11 que expresan las cadenas anti- IGF1 R LCF (kappa) y HCA (gama- 1). El medio de crecimiento celular mamífero inicial al cual se agregaron los suplementos fue medio EX- CELL ACF CHO (Sigma- Aldrich; St. Louis, MO).

Un grupo similar de corridas se realizó en donde no hubo adiciones de alimentos (excepto para glutamina y glucosa en proceso). Bajo estas condiciones, se obtuvo un título de 435 mg/L. El título se estimó al cuantificar la inmunoglobulina producida la cual se adhirió específicamente a la proteína A. Los títulos obtenidos en las siguientes corridas del nivel 3 y proceso mejorado fueron estimadas a partir de la cuantificación de inmunoglobulina que se adhirió a sustrato de cromatografía de fase inversa. Un título estimado de 300 mg/L aproximadamente obtenido en la corrida sin la adición de alimentos habría utilizado el método de cuantificación de fase inversa.

Con relación al título obtenido en la corrida excluyendo la adición de alimentos, el nivel 3 y proceso mejorado (discutidos a continuación) producen títulos muy superiores.

Proceso Mejorado

68

Las células inicialmente se inocularon a $3 - 4 \times 10^5$ células/ml en el medio EX- CELL ACF CHO (Sigma- Aldrich; St. Louis, MO) el cual se precalentó a 37°C y se ajustó a pH 6.8.

5 **Tabla 1. Alimentos agregados para corridas del proceso mejorado.**

Lote	Alimentos agregados	Tiempo agregado	Relación de Volumen (volumen de alimento/volumen del lote)	Cambio de reducción en temperatura en curso
1	Alimento SHYS	Día0 Día3	0.05	Si: día 6 desde 37°C a 34°C
	Alimento 1 CHO	Día3	0.02	
	Alimento 2 CHO		0.02	
2	Alimento SHYS	Día 0 Día3	0.05	Si: día 6 desde 37°C a 34°C
	Alimento 1 CHO	Día 3	0.02	
	Alimento 2 CHO		0.02	
3	Alimento HYS	Día 0 Día 3	0.05	Si: día 6 desde 37°C a 34°C
	Alimento CHO	Día 3	0.02	
	Alimento 1 CHO		0.02	
	Alimento 2 CHO			
4	Alimento HYS	Día 0 Día 3	0.05	Si: día 6 desde 37°C a 34°C
	Alimento 1 CHO	Día 3	0.02	
	Alimento 2 CHO		0.02	
5	Alimento SHYS	Día 0 Día 0	0.05	No
	Alimento aminoácido 50X	Día 0	0.02	
		Día 3 Día 3	0.01	
	Alimento aminoácido 100X		0.02	
	Alimento 1 CHO		0.02	

	Alimento 2 CHO			
--	----------------	--	--	--

Alimento SHYS: un alimento de hidrolisato de soya 200 g/L (acuoso) de DMV international (Netherlands)

Alimento Hys: un alimento de hidrolisato de soya 200 g/L (acuoso) de Kerry Biosciences

Alimento 1 CHO : Alimento de vitamina/sal 50X

5 Alimento 2 CHO : Alimento Nutriente 50X

Alimento aminoácido 50X

Alimento aminoácido 100X

El pH se monitoreó continuamente y se ajustó a un punto de ajuste de 6.8. La concentración de oxígeno se monitoreó y se ajustó a un punto de ajuste de 60%. La temperatura se monitoreó continuamente y se mantuvo a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio de reducción en temperatura en curso a 34°C se realizó en los lotes indicados.

10

La glucosa se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo cae por debajo de 1.5 g/litro y L- glutamina se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glutamina en el medio de cultivo cae por debajo de 150 mg/litro. La osmolalidad se cambió a más de 400 mOsm a partir de la adición del alimento nutriente. Las células se cosecharon entre los días 21- 24, excepto para los lotes 3 y 4 los cuales se cosecharon antes (días 14- 18); generalmente, cuando la viabilidad celular fue reducida a 60% aproximadamente.

15

20 **Tabla 2. Resultados de corridas del proceso mejorado**

Lote	Título	Productividad Específica
1	2.2	26
2	2.3	27
3*	1.9	30
4*	1.6	33
5	2.2	26

* Corrida de lote abreviada

La adición de alimentos aminoácidos puede omitirse cuando los alimentos nutrientes se utilizan en el proceso mejorado.

5 **El nivel 3**

Las células se inocularon inicialmente a $3 - 4 \times 10^5$ células/ml en el medio EX- CELL ACF CHO (Sigma- Aldrich; St. Louis, MO) el cual se precalentó a 37°C y se ajustó a pH 6.8.

10 **Tabla 3. Alimentos agregados para el nivel 3**

Lote	Alimentos agregados	Tiempo Agregado	Relación de volumen (volumen de alimento/volumen del lote)	Un cambio de reducción en temperatura en curso
A	SHYS alimento	Día 0	0.05	No
	Alimento aminoácido 50X	Día 0	0.02	
	Alimento aminoácido 100X	Día 0	0.01	
	Alimento 1 CHO	Día 3	0.02	
B	Alimento SHYS	Día 0	0.05	No
	Alimento aminoácido 50X	Día 0	0.02	
	Alimento aminoácido 100X	Día 0	0.01	
	Alimento CHO 1	Día 3	0.02	

Alimento SHYS: un alimento de hidrolisato de soya de 200 g/L (acuoso) de DMV international (Netherlands)

Alimento 1 CHO : Alimento de Vitamina/sal 50X

15 Alimento aminoácido 50X

Alimento aminoácido 100X

El pH continuamente se monitoreó y se mantuvo a 6.8 ± 0.02 .

La concentración de oxígeno se monitoreó y se ajustó a un punto de ajuste de 60%.

La temperatura continuamente se monitoreó y se mantuvo a $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

20 La glucosa se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo cae por debajo de 1.5 g/litro y L- glutamina se agrega, por ejemplo, cuando la concentración de glutamina en el medio de cultivo cae por debajo de 150 mg/litro.

Tabla 4. Resultados de corridas del nivel 3

Lote	Título (g/L)	Productividad Específica
A	1.4	19
B	1.2	22

Los alimentos utilizados y las concentraciones finales de los componentes de cada alimento se divulgan a continuación.

5

Tabla 5. Alimento de vitamina/sal

Componente	Concentración en alimento (g/L)	Concentración final en cultivo (mg/L)
Selenito de sodio	7.13×10^{-4}	0.01426
Sulfato de adenina	0.0816	1.632
Adenosina	0.88	17.6
Citidina	0.88	17.6
Guanosina	0.88	17.6
Uridina	0.88	17.6
Hipoxantina	0.59	11.8
L- citrulina	0.63	12.6
L- ornitina- HCl	1.28	25.6
Biotina	0.014	0.28
Dinucleótido de flavina adenina	0.0025	0.05
Ácido fólico	0.23	4.6
Ácido lipóico	0.026	0.52
Niacina	1.57	31.4
HCl de Piridoxina	0.15	3

16

Riboflavina	0.093	1.86
HCl Tiamina	0.8	16
Vitamina E	0.0188	0.376
Vitamina B12	0.17	3.4
Cloruro de colina	2.51	50.2
Hcl de etanolamina	0.22	4.4
L- Inositol	3.66	73.2
Timidina	0.39	7.8
2HCl de Putrescina	0.02	0.4
Progesterona	0.00075	0.015
Pantotenato de D- calcio	1.19	23.8

Tabla 6. Alimento Aminoácido #1 (50X).

Componente	Concentración en alimento (g/L)	Concentración final en cultivo (mg/L)
L- Arginina	6.32	126.4
L- Cistina	1.7	34
L- histidina	2.1	42
L- Isoleucina	2.6	52
L- Leucina	2.6	52
L- lisina	3.6	72
L- Metionina	0.76	15.2
L- fenilalanina	1.65	33
L- treonina	2.38	47.6
L- triptófano	0.51	10.2
L- tirosina	1.8	36
L- valina	2.34	46.8

5 Tabla 7. Alimento aminoácido #2 (100X).

Componente	Concentración en alimento (g/L)	Concentración final en cultivo (mg/L)
L- Alanine	0.89	8.9
L- Asparagina	1.5	30
L- Ácido aspártico	1.33	26.6
L- Ácido glutámico	1.47	29.4
Glicina	0.75	15
L- Prolina	1.15	23
L- Serina	1.05	21

Tabla 8. Alimento Nutriente.

5

Componente	Concentración en alimento (g/L)	Concentración final en cultivo (mg/L)
L- Asparagina	40.6	812
L- Serina	13	260
L- prolina	10.81	216
L- Isoleucina	18.53	370
L- cisteina- HCl	11.19	224
L- Leucina	16.58	332
L- treonina	8.2	164
L- tirosina	9.9	198
L- Arginina	9.29	186
L- ácido aspártico	3.56	71
L- ácido glutámico	6.28	126
Glicina	2.83	57
L- histidina	6.23	125
L- metionina	6.58	132

L- triptófano	4.93	99
L- lisina	14.66	293
L- fenilalanina	8.64	174
L- valina	13.08	262
Sulfato sódico monobásico	14.41	288.2
Sulfato de zinc	0.054	1.08
Sulfato cúprico	0.00016	0.0032
Vanadato de amonio	0.000039	0.00078
Cloruro de cobalto	0.000125	0.0025
Dicloruro hexahidrato de níquel	0.00002	0.0004
Dehidrato molibdato de sodio	0.000008	0.00016
Dihidrato cloruro de estaño	0.000004	0.00008
Cloruro de manganeso tetrahidrato	0.000015	0.0003

El presente invento no está limitado en alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente. En realidad, el alcance del presente invento incluye realizaciones específicamente divulgadas en la presente y otras realizaciones no específicamente divulgadas en la presente; las divulgaciones específicamente divulgadas en la presente no necesariamente pretenden ser exhaustivas. Varias modificaciones del invento además de aquellas descritas en la presente serán manifiestas a expertos en el estado de la técnica a partir de la anterior descripción. Tales modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Patentes, publicaciones de patentes, publicaciones, descripciones de productos, y protocolos son citados a lo largo de esta solicitud, las divulgaciones de las mismas se incorporan en la presente como referencia en sus totalidades para todo propósito.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial con células huésped que expresan la proteína y agregar suplementos que comprenden:

Glucosa;

L- Glutamina;

Hidrolisato de soya o hidrolisato de trigo o ambos;

Sulfato de adenina;

Adenosina;

vanadato de amonio;

Biotina;

Cloruro de colina;

Cloruro de cobalto;

Sulfato cúprico;

Citidina;

Pantotenato de D- calcio;

Hcl de etanolamina;

Dinucleótido de flavina adenina;

Ácido fólico;

Glicina;

Guanosina;

Hipoxantina;

L- Inositol;

L- alanine;

L- Arginina;

L- Asparagina;

L- ácido aspártico;

L- citrulina;

L- cisteina- HCl;

L- Cistina;

L- Ácido glutámico;



L- histidina;
Ácido lipoico;
L- Isoleucina;
L- Leucina;
L- lisina;
L- metionina;
L- ornitina- HCl;
L- fenilalanina;
L- prolina;
L- Serina;
L- treonina;
L- triptófano;
L- tirosina;
L- valina ;
Cloruro de manganeso Tetrahidrato;
Niacina;
Dicloruro hexahidrato de níquel;
Progesterona;
2HCl Putrescina;
HCl de Piridoxina;
Riboflavina;
Molibdato dehidrato sódico;
Sulfato sódico monobásico;
Selenito de sodio;
HCl Tiamina;
Timidina;
Cloruro dehidrato de estaño;
Uridina;
Vitamina B12;
Vitamina E; y
Sulfato de zinc;

al medio.

2. El método de la reivindicación 1 en donde las concentraciones finales de los componentes agregados al medio a partir los suplementos son aquellas divulgadas a continuación:

Sulfato de adenina:	1.632 mg/litro
Adenosina:	17.6 mg/litro
Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
Biotina:	0.28 mg/litro
Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro

cd

Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
Citidina:	17.6 mg/litro
Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
Etanolamina HCl:	4.4 mg/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0.05 mg/litro
Acido fólico:	4.6 mg/litro
Glicina	72 mg/litro
Guanosina:	17.6 mg/litro
Hipoxantina:	11.8 mg/litro
L- Inositol:	73.2 mg/litro
L- alanina:	8.9 mg/litro
L- Arginina	312.4 mg/litro
L- Asparagina:	842 mg/litro
L- ácido aspártico	97.6 mg/litro
L- citrulina:	12.6 mg/litro
L- cisteina- HCl	224 mg/litro
L- Cistina:	34 mg/litro
L- Ácido glutámico	155.4 mg/litro
L- histidina	167 mg/litro
ácido lipóico:	0.52 mg/litro
L- Isoleucina	422 mg/litro
L- Leucina	384 mg/litro
L- lisina	365 mg/litro
L- metionina	147.2 mg/litro
L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
L- fenilalanina	207 mg/litro
L- prolina	239 mg/litro
L- Serina:	281 mg/litro
L- treonina	211.6 mg/litro
L- triptófano	109.2 mg/litro
L- tirosina	234 mg/litro

L- valina	308.8 mg/litro
Cloruro de manganeso tetrahidrato:	0.0003 mg/litro
Niacina:	31.4 mg/litro
Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro
Progesterona:	0.015 mg/litro
2HCl Putrescina :	0.4 mg/litro
HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
Riboflavina:	1.86 mg/litro
Molibdato dehidrato sódico:	0.00016 mg/litro
Sulfato sódico monobásico:	288.2 mg/litro
Selenito de sodio:	0.01426 mg/litro
HCl Tiamina:	16 mg/litro
Timidina:	7.8 mg/litro
Cloruro dehidrato de estaño:	0.00008 mg/litro
Uridina:	17.6 mg/litro
Vitamina B12:	3.4 mg/litro
Vitamina E:	0.376 mg/litro
Sulfato de zinc:	1.08 mg/litro
Glucosa	1.5 g/litro
L- Glutamina	150 mg/litro

3. El método de la reivindicación 1 en donde los suplementos son agregados a partir de un alimento aminoácido que comprende aminoácidos en aproximadamente las siguientes concentraciones:

L- Arginina:	6.32 g/litro
L- Cistina:	1.7 g/litro
L- histidina:	2.1 g/litro
L- Isoleucina:	2.6 g/litro
L- Leucina:	2.6 g/litro
L- lisina:	3.6 g/litro
L- Metionina:	0.76 g/litro



L- fenilalanina:	1.65 g/litro
L- treonina:	2.38 g/litro
L- triptófano:	0.51 g/litro
L- tirosina:	1.8 g/litro
L- valina:	2.34 g/litro

4. El método de la reivindicación 3 en donde se agregan 20 ml aproximadamente de alimento aminoácido por litro de medio de cultivo.

5. El método de la reivindicación 1 en donde los suplementos son agregados a partir de un alimento aminoácido que comprende aminoácidos en aproximadamente las siguientes concentraciones:

L- alanina:	0.89 g/litro
L- Asparagina:	1.5 g/litro
L- ácido aspártico:	1.33 g/litro
L- Ácido glutámico:	1.47 g/litro
Glicina:	0.75 g/litro
L- prolina:	1.15 g/litro
L- Serina:	1.05 g/litro

6. El método de la reivindicación 5 en donde se agregan 10 ml aproximadamente de alimento aminoácido por litro de medio de cultivo.

7. El método de la reivindicación 1 en donde los suplementos son agregados a partir de un alimento nutriente que comprende suplementos en aproximadamente las siguientes concentraciones:

L- Asparagina:	40.6 g/litro
L- prolina	10.81 g/litro
L- Isoleucina	18.53 g/litro
L- cisteina- HCl	11.19 g/litro
L- Leucina	16.58 g/litro

L- treonina	8.2 g/litro
L- tirosina	9.9 g/litro
L- Arginina	9.29 g/litro
L- ácido aspártico	3.56 g/litro
L- Ácido glutámico	6.28 g/litro
Glicina	2.83 g/litro
L- histidina	6.23 g/litro
L- metionina	6.58 g/litro
L- triptófano	4.93 g/litro
L- lisina	14.66 g/litro
L- fenilalanina	8.64 g/litro
L- valina	13.08 g/litro
L- Serina:	13 g/litro
Sulfato sódico monobásico:	14.41 g/litro
Sulfato de zinc:	0.054 g/litro
Sulfato cúprico:	0.00016 g/litro
Vanadato de amonio:	0.000039 g/litro
Cloruro de cobalto:	0.000125 g/litro
Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.00002 g/litro
Molibdato dehidrato sódico:	0.000008 g/litro
Cloruro dehidrato de estaño:	0.000004 g/litro
Cloruro de manganeso: tetrahidrato:	0.000015 g/litro.

8. El método de la reivindicación 7 en donde se agregan 20 ml aproximadamente de alimento nutriente por litro de medio de cultivo.

9. El método de la reivindicación 1 en donde los suplementos son agregados a partir de un alimento de vitamina/sal que comprende suplementos en aproximadamente las siguientes concentraciones:

Selenito de sodio:	7.13×10^{-4} g/litro
Sulfato de adenina:	0.0816 g/litro

Adenosina:	0.88 g/litro
Citidina:	0.88 g/litro
Guanosina:	0.88 g/litro
Uridina:	0.88 g/litro
Hipoxantina:	0.59 g/litro
L- citrulina:	0.63 g/litro
L- ornitina- HCl:	1.28 g/litro
Biotina:	0.014 g/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0.0025 g/litro
Ácido fólico:	0.23 g/litro
ácido lipóico:	0.026 g/litro
Niacina:	1.57 g/litro
HCl de Piridoxina:	0.15 g/litro
Riboflavina:	0.093 g/litro
HCl Tiamina:	0.8 g/litro
Vitamina E:	0.0188 g/litro
Vitamina B12:	0.17 g/litro
Cloruro de colina:	2.51 g/litro
HCl de etanolamina:	0.22 g/litro
L- Inositol:	3.66 g/litro
Timidina:	0.39 g/litro
2HCl Putrescina :	0.02 g/litro
Progesterona:	0.00075 g/litro
Pantotenato de D- calcio:	1.19 g/litro

10. El método de la reivindicación 9 en donde se agregan 20 ml aproximadamente de alimento de vitamina/sal por litro de medio de cultivo.

11. El método de la reivindicación 1 que comprende además cosechar el medio desde las células huésped; en donde la proteína es secretada desde dichas células hacia el medio.

12. El método de la reivindicación 13 en donde el medio de cultivo es cosechado a partir de células huésped cuando la viabilidad de las células está por debajo de 60%.

13. El método de la reivindicación 11 que comprende además purificar el medio de cultivo de células mediante centrifugación del medio y/o filtración en profundidad del medio y/o filtración del medio a través de un filtro de 0.2 micras.

14. El método de la reivindicación 1 en donde la proteína es una o más cadenas de inmunoglobulina de un anticuerpo o fragmento fijador de antígenos del mismo.

15. El método de la reivindicación 14 en donde el anticuerpo o fragmento se fija específicamente a IGF1R.

16. El método de la reivindicación 15 en donde el anticuerpo o fragmento comprende una cadena de inmunoglobulina pesada que comprende la secuencia aminoácida presentada en un miembro seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3-6, 13, 21 y 26; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma; y/o una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOS: 2, 7-9, 17 y 25 ; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma.

17. El método de la reivindicación 16 en donde el anticuerpo o fragmento secretado desde la célula hospedera es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20- 137 de SEQ ID NO: 8 ó 9.

18. El método de la reivindicación 17 en donde la inmunoglobulina de cadena liviana está enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante kappa y la inmunoglobulina de cadena pesada es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1.

19. El método de la reivindicación 1 en donde el medio de crecimiento celular mamífero inicial en el cual se agregan los suplementos comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y no comprende L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales.

20. Un método para producir un anticuerpo que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial, pre- calentado a 37°C; tal medio inicial comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y el cual no comprende L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con células huésped CHO DXB11 que expresan la inmunoglobulina de cadena liviana e inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo, a una densidad celular de $2.5 \cdot 10^5$ células/ml aproximadamente; y agregar los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente con o inmediatamente después de dicha inoculación:

hidrolisato de soya a una concentración final de 10 g/litro aproximadamente; y, opcionalmente, un alimento aminoácido en donde la concentración de los componentes agregados por dicho alimento aminoácido son aproximadamente aquellos divulgados a continuación.

L- Arginina:	126.4 mg/litro
L- Cistina:	34 mg/litro
L- histidina:	42 mg/litro
L- Isoleucina:	52 mg/litro
L- Leucina:	52 mg/litro
L- lisina:	72 mg/litro
L- Metionina:	15.2 mg/litro
L- fenilalanina:	33 mg/litro
L- treonina:	47.6 mg/litro
L- triptófano:	10.2 mg/litro
L- tirosina:	36 mg/litro

L- valina:	46.8 mg/litro
L- alanine:	8.9 mg/litro
L- Asparagina:	30 mg/litro
L- ácido aspártico:	26.6 mg/litro
L- Ácido glutámico:	29.4 mg/litro
Glicina:	15 mg/litro
L- prolina:	23 mg/litro
L- Serina:	21 mg/litro

y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1.2×10^6 células/ml aproximadamente, agregar alimentos suplementarios en donde las concentraciones de los componentes agregados por dichos alimentos suplementarios son aproximadamente aquellas divulgadas a continuación.

Selenito de sodio:	0.01426 mg/litro
Sulfato de adenina:	1.632 mg/litro
Adenosina:	17.6 mg/litro
Citidina:	17.6 mg/litro
Guanosina:	17.6 mg/litro
Uridina:	17.6 mg/litro
Hipoxantina:	11.8 mg/litro
L- citrulina:	12.6 mg/litro
L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
Biotina:	0.28 mg/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0.05 mg/litro
Ácido fólico:	4.6 mg/litro
Ácido lipoico:	0.52 mg/litro
Niacina:	31.4 mg/litro
HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
Riboflavina:	1.86 mg/litro
HCl Tiamina:	16 mg/litro
Vitamina E:	0.376 mg/litro
Vitamina B12	3.4 mg/litro



Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
HCl de etanolamina:	4.4 mg/litro
L- Inositol:	73.2 mg/litro
Timidina:	7.8 mg/litro
2HCl Putrescina :	0.4 mg/litro
Progesterona:	0.015 mg/litro
Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
L- Asparagina:	812 mg/litro
L- prolina	216 mg/litro
L- Isoleucina	370 mg/litro
L- cisteina- HCl	224 mg/litro
L- Leucina	332 mg/litro
L- treonina	164 mg/litro
L- tirosina	198 mg/litro
L- Arginina	186 mg/litro
L- ácido aspártico	71 mg/litro
L- Ácido glutámico	126 mg/litro
Glicina	57 mg/litro
L- histidina	125 mg/litro
L- metionina	132 mg/litro
L- triptófano	99 mg/litro
L- lisina	293 mg/litro
L- fenilalanina	174 mg/litro
L- valina	262 mg/litro
L- Serina:	260 mg/litro
Sulfato sódico monobásico:	288.2 mg/litro
Sulfato de zinc:	1.08 mg/litro
Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro
Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro

Molibdato dehidrato sódico: 0.00016 mg/litro

y, mantener la concentración de glucosa en el medio a aproximadamente 1.5 g/litro y mantener la concentración de L- glutamina en el medio a aproximadamente 150 mg/litro; y durante el crecimiento celular mantener la concentración de O₂ en 60% aproximadamente; pH en 6.8 ± 0.02 aproximadamente y la temperatura en $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; y, opcionalmente, retirar las células huésped del medio cuando la viabilidad celular esté por debajo de 60% aproximadamente.

21. El método de la reivindicación 20 en donde el anticuerpo comprende una cadena de inmunoglobulina pesada que comprende la secuencia aminoácida divulgada en un miembro seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3-6, 13, 21 y 26; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma; y/o una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 7, 9, 17 y 25 ; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma.

22. El método de la reivindicación 21 en donde el anticuerpo o fragmento comprende un anticuerpo secretado a partir de las células huésped que comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20- 137 de la SEQ ID NO: 8 ó 9.

23. El método de la reivindicación 22 en donde la inmunoglobulina de cadena liviana está enlazada a una cadena inmunoglobulina constante kappa y la inmunoglobulina de cadena pesada es enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1.

24. El método de la reivindicación 23 que comprende además recuperar el medio de cultivo de las células mediante centrifugación de disco apilado del medio, filtración en profundidad del medio y/o filtración del medio a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.2 micras.

Handwritten signature and the letter 'S'.

25. El método de la reivindicación 24 que comprende además purificar las inmunoglobulinas del medio mediante fraccionamiento cromatográfico en columna.

26. Un medio de cultivo celular líquido acuoso que comprende:
aproximadamente 10g/litro de hidrolisato de soya,
aproximadamente 1.5 g/litro Glucosa,
aproximadamente 150 mg/litro de L- Glutamina,
pH de aproximadamente 6.8 ± 0.02,
HEPES,
Buffers de bicarbonato de sodio,
Sales inorgánicas,
Aminoácidos no esenciales,
Insulina humana recombinane,
Elementos traza,
Surfactantes,
una alimento aminoácido en donde las concentraciones de los componentes agregados por dicho alimento aminoácido son aproximadamente aquellos presentados a continuación:

L- Arginina:	126.4 mg/litro
L- Cistina:	34 mg/litro
L- histidina:	42 mg/litro
L- Isoleucina:	52 mg/litro
L- Leucina:	52 mg/litro
L- lisina:	72 mg/litro
L- Metionina:	15.2 mg/litro
L- fenilalanina:	33 mg/litro
L- treonina:	47.6 mg/litro
L- triptófano:	10.2 mg/litro
L- tirosina:	36 mg/litro

L- valina:	46.8 mg/litro
L- alanina:	8.9 mg/litro
L- Asparagina:	30 mg/litro
L- ácido aspártico:	26.6 mg/litro
L- Ácido glutámico:	29.4 mg/litro
Glicina:	15 mg/litro
L- prolina:	23 mg/litro
L- Serina:	21 mg/litro

en donde el medio no comprende antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales.

27. Un medio de cultivo líquido acuoso producido por un proceso que comprende inocular un medio de crecimiento celular mamífero inicial, pre- calentado a 37°C; tal medio comprende HEPES, buffers de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, elementos traza y surfactantes; y el cual no comprende L- glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con células huésped CHO DXB11 que expresan la inmunoglobulina de cadena liviana e inmunoglobulina de cadena pesada, a una densidad celular de 2.5- 5 X 10⁵ células/ml aproximadamente; y agregar los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente con o inmediatamente después de dicha inoculación:

hidrolisato de soya a una concentración final de aproximadamente 10 g/litro;
y, opcionalmente, un alimento aminoácido en donde la concentración de los componentes agregados por dicho alimento aminoácido son aproximadamente aquellos presentados a continuación:

L- Arginina:	126.4 mg/litro
L- Cistina:	4 mg/litro
L- histidina:	42 mg/litro
L- Isoleucina:	52 mg/litro
L- Leucina:	52 mg/litro
L- lisina:	72 mg/litro
L- Metionina:	15.2 mg/litro
L- fenilalanina:	33 mg/litro



L- treonina:	47.6 mg/litro
L- triptófano:	10.2 mg/litro
L- tirosina:	36 mg/litro
L- valina:	46.8 mg/litro
L- alanine:	8.9 mg/litro
L- Asparagina:	30 mg/litro
L- ácido aspártico:	26.6 mg/litro
L- Ácido glutámico:	29.4 mg/litro
Glicina:	15 mg/litro
L- prolina:	23 mg/litro
L- Serina:	21 mg/litro

y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1.2×10^6 células/ml aproximadamente, agregar alimentos suplementarios en donde las concentraciones de los componentes agregados por dichos alimentos suplementarios son aproximadamente aquellas divulgadas a continuación.

Selenito de sodio:	0.01426 mg/litro
Sulfato de adenina:	1.632 mg/litro
Adenosina:	17.6 mg/litro
Citidina:	17.6 mg/litro
Guanosina:	17.6 mg/litro
Uridina:	17.6 mg/litro
Hipoxantina:	11.8 mg/litro
L- citrulina:	12.6 mg/litro
L- ornitina- HCl:	25.6 mg/litro
Biotina:	0.28 mg/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0.05 mg/litro
Ácido fólico:	4.6 mg/litro
ácido lipóico:	0.52 mg/litro
Niacina:	31.4 mg/litro
HCl de Piridoxina:	3 mg/litro
Riboflavina:	1.86 mg/litro

HCl Tiamina:	16 mg/litro
Vitamina E:	0.376 mg/litro
Vitamina B12:	3.4 mg/litro
Cloruro de colina:	50.2 mg/litro
HCl de etanolamina:	4.4 mg/litro
L- Inositol:	73.2 mg/litro
Timidina:	7.8 mg/litro
2HCl Putrescina :	0.4 mg/litro
Progesterona:	0.015 mg/litro
Pantotenato de D- calcio:	23.8 mg/litro
L- Asparagina:	812 mg/litro
L- prolina	216 mg/litro
L- Isoleucina	370 mg/litro
L- cisteina- HCl	224 mg/litro
L- Leucina	332 mg/litro
L- treonina	164 mg/litro
L- tirosina	198 mg/litro
L- Arginina	186 mg/litro
L- ácido aspártico	71 mg/litro
L- Ácido glutámico	126 mg/litro
Glicina	57 mg/litro
L- histidina	125 mg/litro
L- metionina	132 mg/litro
L- triptófano	99 mg/litro
L- lisina	293 mg/litro
L- fenilalanina	174 mg/litro
L- valina	262 mg/litro
L- Serina:	260 mg/litro
Sulfato sódico monobásico:	288.2 mg/litro
Sulfato de zinc:	1.08 mg/litro
Sulfato cúprico:	0.0032 mg/litro

Vanadato de amonio:	0.00078 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0.0025 mg/litro
Dicloruro hexahidrato de níquel:	0.0004 mg/litro
Molibdato dehidrato sódico:	0.00016 mg/litro

y, mantener la concentración de glucosa en el medio a aproximadamente 1.5 g/litro y mantener la concentración de L- glutamina en el medio a aproximadamente 150 mg/litro; y durante el crecimiento celular mantener la concentración de O₂ en 60% aproximadamente; pH en 6.8 ± 0.02 aproximadamente y la temperatura en $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

28. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 27 en donde las células huésped comprenden un vector que codifica las inmunoglobulinas del anticuerpo en donde el anticuerpo es secretado en el medio.

29. El medio de cultivo acuoso de la reivindicación 28 en donde la viabilidad celular del huésped es aproximadamente 60% o menos y/o en donde el crecimiento de células huésped ha seguido su curso durante 14 a 24 días.

30. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 29 en donde las células huésped son retiradas del medio.

31. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 30 en donde las células huésped son retiradas del medio mediante centrifugación del medio y/o filtración en profundidad del medio y/o filtración del medio a través de un filtro de 0.2 micras.

32. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 31 en donde el anticuerpo se fija específicamente a IGF1R.

33. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 32 en donde la cadena de inmunoglobulina pesada comprende la secuencia aminoácida presentada en un miembro

seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos: 1, 3-6, 13, 21 y 26 ; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma.

y una cadena de inmunoglobulina liviana que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 7-9, 17 y 25 ; o un fragmento maduro de la misma o una o más CDRs de la misma.

34. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 33 en donde el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo el cual es secretado a partir de la célula huésped y que comprende una inmunoglobulina de cadena liviana que comprende los aminoácidos 20- 128 de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, ó 6; y una inmunoglobulina de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20- 137 de SEQ ID NO: 8 ó 9.

35. El medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 34 en donde la inmunoglobulina de cadena liviana está enlazada a una cadena inmunoglobulina constante kappa y la inmunoglobulina de cadena pesada está enlazada a una cadena de inmunoglobulina constante gama- 1.

36. Un recipiente que comprende el medio de cultivo líquido acuoso de la reivindicación 27.

37. El recipiente de la reivindicación 36 el cual es un matraz, un biorreactor, un biorreactor de tipo tanque, un biorreactor de bolsa o un biorreactor desechable.

38. El recipiente de la reivindicación 37 en donde el biorreactor es un biorreactor de tipo tanque agitado, un biorreactor de columna de burbujas, un biorreactor de elevación con aire, un biorreactor de lecho fluidizado o un biorreactor de lecho empacado.



RESUMEN

El presente invento proporciona, en parte, métodos para expresar de manera recombinante proteínas a alto nivel junto con medios de cultivos celulares para realizar lo mismo.

Handwritten signature or mark.

UB06873seqlist
SEQUENCE LISTING

<110> Schering Corp.
<120> High titer antibody production
<130> UB06873
<150> 61/100,450
<151> 2008-09-26
<160> 26
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15
Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Val Pro Asp Phe Gln Ser Val
20 25 30
Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45
Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
50 55 60
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
85 90 95
Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110
Leu Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 2
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

UB06873seq1ist

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

21

UB06873seq1ist

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 5
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 6
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

UB06873seq1ist

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 7
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 8
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

8

UB06873seq1ist

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 9
<211> 144
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Val
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Ile Gly Val Ala Ala Ser Tyr Tyr
115 120 125

Phe Gly Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 10
<211> 10
<212> PRT

UB06873seqlist

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys Gly Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Arg Ile Gly Val Ala Ala Ser Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys

41

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Met Pro Val Ala Gly Pro Gly Tyr Phe
115 120 125

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
130 135 140

Ser Ser

UB06873seqlist

145

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gly Met Pro Val Ala Gly Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 21
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

82

UB06873seqlist

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

UB06873seqlist

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu His Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys
85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105



No. 11-037693- -00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:51:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 82

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO I

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	11 037693
	Solicitud internacional	PCT/US2009/058164
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

08872

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

03 JUN. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	11 037693
	Solicitud internacional	PCT/US2009/058164
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

08873

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 03 JUN 2011
adpa11