Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

B.T

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21 EXPEDIENTE No 07-30529

54 TITULO "PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/00

71 SOLICITANTE WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED

Hr 27 03 2007
Robert Cerá

DOMICILIO REPUBLICA DE IRLANDA

74 APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T P No 20 281

22 BOGOTA, D C , 27 de Marzo de 2007

BOGYMD-0000-037529-v1-000

PETITORIO

00001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-09-27 16:13:57 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTES
Cla: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 345

cación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED

Dirección: Little Connell, Newbridge, County Kildare, República de Irlanda

Nacionalidad o Domicilio: República de Irlanda

Lugar de Constitución: República de Irlanda

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: DRAPEAU, Denis; LUAN, Yen-Tuang; MERCER, James, R.; WANG, Wenge y LASKO, Daniel.

Dirección: 55 Old Farm Road, Salem, NH 03079, Estados Unidos; 3 Armand Drive, Chelmsford, MA 01824, Estados Unidos; 226 Hampstead Road, Derry, NH 03038, Estados Unidos; 1 Hollowridge Road, North Chelmsford, MA 01863, Estados Unidos y 19 Gleason Street, Medford, MA 02155, Estados Unidos, respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, China y Estadounidense, respectivamente.

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/030437 Fecha 26-AGO-05

Publicación Internacional No. WO 2006/026445 Fecha 09-MAR-06

(6) Título (54) PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 16/00, C07K 16/22, C07K 16/30, C12N 5/00, C12P 21/02

(8) Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	27-AGO-04	60/605,097
US	27-AGO-04	60/604,941
US	27-AGO-04	60/605,074

(9) Comprobante de pago No. 07-2504, 06-68,530, 06-68531 y 07-8730 **Fecha** 12-ene-7, 6-sep-6, 6-sep-6 y 30-ene-7

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

00002

- [X] 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
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] 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.
- [X] Otros: Extractos, Reporte de búsqueda, notificación de presentación de documento de prioridad y modificación a reivindicaciones.

(11) **FIGURA CARATERISTICA**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

001

00093 34 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-03-27 16:13:57 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTENU
Eva: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 348

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 2,504
FECHA : ENERO 12 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

SOLICITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64321256	11/01/2007	71,059,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	5 TRAMITES DE SOL. DE MODELO DE UTI	283,000.00
		TOTAL : $	283,000.00

SON: DOSCIENTOS OCHENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

020

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-08-27 16:13:57 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTENU
Fre: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 348

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 68,530
FECHA : SEPTIEMBRE 6 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	53778298	06/09/2006	53,952,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	REMISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12	MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	95,000.00
			TOTAL : $	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

020

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-09-27 16:13:57 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYI
Cla: 378 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 348

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 68,531
FECHA : SEPTIEMBRE 6 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53778298	06/09/2006	$3,952,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	95,000.00
		TOTAL : $	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

002

000006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-03-27 16:13:57 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYI
EVE: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 07 - 8,730
FECHA : ENERO 30 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64180719	30/01/2007	58,635,000.00

***** C O N C E P T O *****

CT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	9,000.00
			TOTAL : $	9,000.00

SON: NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No: _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN DEPOSITO

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
9 March 2006 (09.03.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/026445 A1

(51) International Patent Classification:
C12P 21/02 (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/030437

(22) International Filing Date: 26 August 2005 (26.08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/605,097	27 August 2004 (27.08.2004)	US
60/604,941	27 August 2004 (27.08.2004)	US
60/605,074	27 August 2004 (27.08.2004)	US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED [IE/IE]; Little Connell, Newbridge, County Kildare (IE).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): DRAPEAU, Denis [US/US]; 55 Old Farm Road, Salem, NH 03079 (US). LUAN, Yen-Tsung [US/US]; 3 Armand Drive, Chelmsford, MA 01824 (US). MERCER, James, R. [US/US]; 226 Hampstead Road, Derry, NH 03038 (US). WANG, Wenge [CN/US]; 1 Hollowridge Road, North Chelmsford, MA 01863 (US). LASKO, Daniel [US/US]; 19 Gleason Street, Medford, MA 02155 (US).

(74) Agents: JARRELL, Brenda, Herschbach et al.; Choate, Hall & Stewart LLP, Two International Place, Boston, MA 02110 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PRODUCTION OF POLYPEPTIDES

(57) Abstract: An improved system for large scale production of proteins and/or polypeptides in cell culture, particularly in media characterized by one or more of: i) a cumulative amino acid concentration greater than about 70 mM; ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2; iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2; iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1; or v) a combined cumulative glutamine and cumulative asparagine concentration between about 16 and 36 mM, is provided. The use of such a system allows high levels of protein production and lessens accumulation of certain undesirable factors such as ammonium and/or lactate. Additionally, culture methods including a temperature shift, typically including a decrease in temperature when the culture has reached about 20-80% of it maximal cell density, are provided. Alternatively or additionally, the present invention provides methods such that, after reaching a peak, lactate and/or ammonium levels in the culture decrease

WO 2006/026445 A1

PRODUCTION OF POLYPEPTIDES

Related Applications

[0001] This application claims priority to Provisional Patent Application Numbers 60/605,097, 60/604,941, and 60/605,074, each of which was filed August 27, 2004, and each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Background of the Invention

[0002] Proteins and polypeptides have become increasingly important as therapeutic agents. In most cases, therapeutic proteins and polypeptides are produced in cell culture, from cells that have been engineered and/or selected to produce unusually high levels of the particular protein or polypeptide of interest. Control and optimization of cell culture conditions is critically important for successful commercial production of proteins and polypeptides.

[0003] Many proteins and polypeptides produced in cell culture are made in a batch or fed-batch process, in which cells are cultured for a period of time, and then the culture is terminated and the produced protein or polypeptide is isolated. The ultimate amount and quality of protein or polypeptide produced can be dramatically affected by the conditions of the cell culture. For example, traditional batch and fed-batch culture processes often result in production of metabolic waste products that have detrimental effects on cell growth, viability, and production or stability of the protein or polypeptide of interest. While efforts have been made to improve production of proteins and polypeptides in batch and fed-batch culture processes, there remains a need for additional improvements.

[0004] Additionally, significant effort has been invested in the development of defined media (i.e., media assembled from known individual components and lacking serum or other animal byproducts) for use in culturing cells, particularly mammalian cells. Cell growth characteristics can be very different in defined media as contrasted with serum-derived media. There is a particular need for the development of improved systems for producing proteins and polypeptides by cell culture in defined media.

Summary of the Invention

[0005] The present invention provides an improved system for large scale production of proteins and/or polypeptides in cell culture. For example, the present invention provides commercial scale (e.g., 500 L or more) culture methods that utilize a medium characterized by one or more of: i) a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM; ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2; iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2; iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1; or v) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine concentration per unit volume greater than about 16 mM. One of ordinary skill in the art will understand that "cumulative", as used above, refers to the total amount of a particular component or components added over the course of the cell culture, including components added at the beginning of the culture and subsequently added components. In certain preferred embodiments of the invention, it is desirable to minimize "feeds" of the culture over time, so that it is desirable to maximize amounts present initially. Of course, medium components are metabolized during culture so that cultures with the same cumulative amounts of given components will have different absolute levels if those components are added at different times (e.g., all present initially vs. some added by feeds).

[0006] According to the present invention, use of such a medium allows high levels of protein production and lessens accumulation of certain undesirable factors such as ammonium and/or lactate.

[0007] One of ordinary skill in the art will understand that the media formulations of the present invention encompass both defined and non-defined media. In certain preferred embodiments of the present invention, the culture medium is a defined medium in which the composition of the medium is known and controlled.

[0008] In certain preferred embodiments of the present invention, the culture methods include changing the culture from a first set of culture conditions to a second set of culture conditions so that a metabolic shift of the cells is achieved. In some embodiments, this change is performed when the culture has reached about 20-80% of its maximal cell density. In some embodiments, the change involves changing the temperature (or temperature range) at which the culture is maintained.

Alternatively or additionally, the present invention provides methods adjusted so that, after reaching a peak, lactate and/or ammonium levels in the culture decrease over time. In other embodiments, the shift involves shifting the pH, osmolarity or level of chemical inductants, such as alkanoic acids or their salts.

[0009] Cell cultures of the present invention may optionally be supplemented with nutrients and/or other medium components including hormones and/or other growth factors, particular ions (such as sodium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers, vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), amino acids, lipids, or glucose or other energy source. In certain embodiments of the present invention, it may be beneficial to supplement the media with chemical inductants such as hexamethylene-bis(acetamide) ("HMBA") and sodium butyrate ("NaB"). These optional supplements may be added at the beginning of the culture or may be added at a later point in order to replenish depleted nutrients or for another reason. In general, it is desirable to select the initial medium composition to minimize supplementation in accordance with the present invention.

[0010] Various culture conditions may be monitored in accordance with the present invention, including pH, cell density, cell viability, lactate levels, ammonium levels, osmolarity, or titer of the expressed polypeptide or protein.

Brief Description of the Drawing

[0011] Figure 1 shows a comparison of Medium 1 and Medium 2 in shake flasks using anti-GDF-8 cells.

[0012] Figure 2 shows cell growth and viability of anti-GDF-8 cells in Medium 1.

[0013] Figure 3 shows cell growth of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

[0014] Figure 4 shows cell viability of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

[0015] Figure 5 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

[0016] Figure 6 shows lactate levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

[0017] Figure 7 shows anti-GDF-8 titer in control and no glutamine feed culture conditions.

[0018] Figure 8 shows cell density of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved feed culture conditions.

[0019] Figure 9 shows cell viability of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved feed culture conditions.

[0020] Figure 10 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved culture conditions.

[0021] Figure 11 shows lactate levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved culture conditions.

[0022] Figure 12 shows anti-GDF-8 titer in control and glutamine-starved culture conditions.

[0023] Figure 13 shows iron dose response of anti-GDF-8 cells in Medium 1 and Medium 2.

[0024] Figure 14 shows cell density of Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0025] Figure 15 shows cell viability of Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0026] Figure 16 shows anti-Lewis Y titer in Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0027] Figure 17 shows lactate levels in Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0028] Figure 18 shows ammonium levels in Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0029] Figure 19 shows osmolarity of Glutamate and Glutamine fed cultures.

[0030] Figure 20 shows cell density of anti-Lewis Y cells. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

[0031] Figure 21 shows cell viability of anti-Lewis Y cells. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

[0032] Figure 22 shows average titer of anti-Lewis Y culture. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

[0033] Figure 23 shows ammonium levels of anti-Lewis Y cells. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

[0034] Figure 24 shows an impeller jump used in fed-batch cultures.

[0035] Figure 25 shows cell growth of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.

[0036] Figure 26 shows viability of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.

[0037] Figure 27 shows anti-GDF-8 titer under various experimental conditions.

[0038] Figure 28 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

[0039] Figure 29 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

[0040] Figure 30 shows cell growth of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.

[0041] Figure 31 shows anti-GDF-8 titer under various experimental conditions.

[0042] Figure 32 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

[0043] Figure 33 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

[0044] Figure 34 shows cell growth of anti-GDF-8 cells in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0045] Figure 35 shows cell viability of anti-GDF-8 cells in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0046] Figure 36 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0047] Figure 37 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0048] Figure 38 shows glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0049] Figure 39 shows anti-GDF-8 titer in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0050] Figure 40 shows osmolarity of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

[0051] Figure 41 shows cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0052] Figure 42 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0053] Figure 43 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0054] Figure 44 shows glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0055] Figure 45 shows glutamate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0056] Figure 46 shows anti-GDF-8 titer in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0057] Figure 47 shows osmolarity of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

[0058] Figure 48 shows cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of amino acids and vitamins.

[0059] Figure 49 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

[0060] Figure 50 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

[0061] Figure 51 shows glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

[0062] Figure 52 shows anti-GDF-8 titer in media containing various levels of amino acids and vitamins.

[0063] Figure 53 shows cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of vitamins, trace elements B and iron.

[0064] Figure 54 shows lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of vitamins, trace elements B and iron.

[0065] Figure 55 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of vitamins, trace elements B and iron.

[0066] Figure 56 shows anti-GDF-8 titer in media containing various levels of vitamins, trace elements B and iron.

[0067] Figure 57 shows cell growth of anti-GDF-8 cells in Mediums 1, 3 and 9.

[0068] Figure 58 shows anti-GDF-8 titer in Medium 1, 3 and 9.

[0069] Figure 59 shows extrapolated anti-GDF-8 titers for various levels of glutamine alone and total combined glutamine and asparagine.

[0070] Figure 60 shows cell growth of anti-ABeta cells under various media conditions tested.

[0071] Figure 61 shows cell viability of anti-ABeta cells under various media conditions tested.

[0072] Figure 62 shows lactate levels of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

[0073] Figure 63 shows ammonium levels of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

[0074] Figure 64 shows anti-ABeta titer in various media conditions tested.

[0075] Figure 65 shows osmolarity of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

[0076] Figure 66 shows cell growth of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0077] Figure 67 shows viability of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0078] Figure 68 shows residual glucose in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0079] Figure 69 shows glutamine levels in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0080] Figure 70 shows lactate concentration in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0081] Figure 71 shows ammonium levels in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

[0082] Figure 72 shows TNFR-Ig relative titer under various experimental conditions.

[0083] Figure 73 shows cell densities of anti-GDF-8 cells grown in 6000 L and 1 L bioreactors.

[0084] Figure 74 shows titers of anti-GDF-8 cells grown in 6000 L and 1 L bioreactors.

[0085] Figure 75 shows lactate levels of anti-GDF-8 cells grown in 6000 L and 1 L bioreactors.

[0086] Figure 76 shows ammonium levels of anti-GDF-8 cells grown in 6000 L and 1 L bioreactors.

Definitions

[0087] "About", "Approximately": As used herein, the terms "about" and "approximately", as applied to one or more particular cell culture conditions, refer

to a range of values that are similar to the stated reference value for that culture condition or conditions. In certain embodiments, the term "about" refers to a range of values that fall within 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 percent or less of the stated reference value for that culture condition or conditions.

[0088] "Amino acid": The term "amino acid" as used herein refers to any of the twenty naturally occurring amino acids that are normally used in the formation of polypeptides, or analogs or derivatives of those amino acids. Amino acids of the present invention are provided in medium to cell cultures. The amino acids provided in the medium may be provided as salts or in hydrate form.

[0089] "Antibody": The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule or an immunologically active portion of an immunoglobulin molecule, such as a Fab or $F(ab')_2$ fragment, that contains one or more antigen binding sites which specifically bind (immunoreact with) an antigen. The terms "monoclonal antibodies" and "monoclonal antibody composition", as used herein, refer to a clonal population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of an antigen, whereas the terms "polyclonal antibodies" and "polyclonal antibody composition" refer to a population of antibody molecules that contain multiple species of antigen binding sites capable of interacting with a particular antigen. The definition of monoclonal antibodies includes both clonal molecules derived by traditional technologies as well as molecules of defined sequence derived by manipulation or mutation of specific residues, for example, humanized antibodies.

[0090] "Batch culture": The term "batch culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which all the components that will ultimately be used in culturing the cells, including the medium (see definition of "medium" below) as well as the cells themselves, are provided at the beginning of the culturing process. A batch culture is typically stopped at some point and the cells and/or components in the medium are harvested and optionally purified.

[0091] "Bioreactor": The term "bioreactor" as used herein refers to any vessel used for the growth of a mammalian cell culture. The bioreactor can be of any size so long as it is useful for the culturing of mammalian cells. Typically, the

bioreactor will be at least 1 liter and may be 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,0000 liters or more, or any volume in between. The internal conditions of the bioreactor, including, but not limited to pH and temperature, are typically controlled during the culturing period. The bioreactor can be composed of any material that is suitable for holding mammalian cell cultures suspended in media under the culture conditions of the present invention, including glass, plastic or metal. The term "production bioreactor" as used herein refers to the final bioreactor used in the production of the polypeptide or protein of interest. The volume of the large-scale cell culture production bioreactor is typically at least 500 liters and may be 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,0000 liters or more, or any volume in between. One of ordinary skill in the art will be aware of and will be able to choose suitable bioreactors for use in practicing the present invention.

[0092] "Cell density": The term "cell density" as used herein refers to that number of cells present in a given volume of medium.

[0093] "Cell viability": The term "cell viability" as used herein refers to the ability of cells in culture to survive under a given set of culture conditions or experimental variations. The term as used herein also refers to that portion of cells which are alive at a particular time in relation to the total number of cells, living and dead, in the culture at that time.

[0094] "Culture", "Cell culture" and "Mammalian cell culture": These terms as used herein refer to a mammalian cell population that is suspended in a medium (see definition of "medium" below) under conditions suitable to survival and/or growth of the cell population. As will be clear to those of ordinary skill in the art, these terms as used herein may refer to the combination comprising the mammalian cell population and the medium in which the population is suspended.

[0095] "Fed-batch culture": The term "fed-batch culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which additional components are provided to the culture at some time subsequent to the beginning of the culture process. The provided components typically comprise nutritional supplements for the cells which have been depleted during the culturing process. A fed-batch culture is typically stopped at some point and the cells and/or components in the medium are harvested and optionally purified.

[0096] "Fragment": The term "fragment" as used herein refers to polypeptides and is defined as any discrete portion of a given polypeptide that is unique to or

characteristic of that polypeptide. The term as used herein also refers to any discrete portion of a given polypeptide that retains at least a fraction of the activity of the full-length polypeptide. Preferably the fraction of activity retained is at least 10% of the activity of the full-length polypeptide. More preferably the fraction of activity retained is at least 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% of the activity of the full-length polypeptide. More preferably still the fraction of activity retained is at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the activity of the full-length polypeptide. Most preferably, the fraction of activity retained is 100% of the activity of the full-length polypeptide. The term as used herein also refers to any portion of a given polypeptide that includes at least an established sequence element found in the full-length polypeptide. Preferably, the sequence element spans at least 4-5, more preferably at least about 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 or more amino acids of the full-length polypeptide.

[0097] "Gene": The term "gene" as used herein refers to any nucleotide sequence, DNA or RNA, at least some portion of which encodes a discrete final product, typically, but not limited to, a polypeptide, which functions in some aspect of cellular metabolism or development. The term is not meant to refer only to the coding sequence that encodes the polypeptide or other discrete final product, but may also encompass regions preceding and following the coding sequence that modulate the basal level of expression (see definition of "genetic control element" below), as well as intervening sequences ("introns") between individual coding segments ("exons").

[0098] "Genetic control element": The term "genetic control element" as used herein refers to any sequence element that modulates the expression of a gene to which it is operably linked. Genetic control elements may function by either increasing or decreasing the expression levels and may be located before, within or after the coding sequence. Genetic control elements may act at any stage of gene expression by regulating, for example, initiation, elongation or termination of transcription, mRNA splicing, mRNA editing, mRNA stability, mRNA localization within the cell, initiation, elongation or termination of translation, or any other stage of gene expression. Genetic control elements may function individually or in combination with one another.

[0099] "Hybridoma": The term "hybridoma" as used herein refers to a cell created by fusion of an immortalized cell derived from an immunologic source and

an antibody-producing cell. The resulting hybridoma is an immortalized cell that produces antibodies. The individual cells used to create the hybridoma can be from any mammalian source, including, but not limited to, rat, pig, rabbit, sheep, pig, goat, and human. The term also encompasses trioma cell lines, which result when progeny of heterohybrid myeloma fusions, which are the product of a fusion between human cells and a murine myeloma cell line, are subsequently fused with a plasma cell. Furthermore, the term is meant to include any immortalized hybrid cell line that produces antibodies such as, for example, quadromas (See, e.g., Milstein et al., Nature, 537:3053 (1983)).

[00100] "Integrated Viable Cell Density": The term "integrated viable cell density" as used herein refers to the average density of viable cells over the course of the culture multiplied by the amount of time the culture has run. Assuming the amount of polypeptide and/or protein produced is proportional to the number of viable cells present over the course of the culture, integrated viable cell density is a useful tool for estimating the amount of polypeptide and/or protein produced over the course of the culture.

[00101] "Medium", "Cell culture medium", "Culture medium": These terms as used herein refer to a solution containing nutrients which nourish growing mammalian cells. Typically, these solutions provide essential and non-essential amino acids, vitamins, energy sources, lipids, and trace elements required by the cell for minimal growth and/or survival. The solution may also contain components that enhance growth and/or survival above the minimal rate, including hormones and growth factors. The solution is preferably formulated to a pH and salt concentration optimal for cell survival and proliferation. The medium may also be a "defined media" – a serum-free media that contains no proteins, hydrolysates or components of unknown composition. Defined media are free of animal-derived components and all components have a known chemical structure.

[00102] "Metabolic waste product": The term "metabolic waste product" as used herein refers to compounds produced by the cell culture as a result of normal or non-normal metabolic processes that are in some way detrimental to the cell culture, particularly in relation to the expression or activity of a desired recombinant polypeptide or protein. For example, the metabolic waste products may be detrimental to the growth or viability of the cell culture, may decrease the amount of recombinant polypeptide or protein produced, may alter the folding, stability,

glycosylation or other post-translational modification of the expressed polypeptide or protein, or may be detrimental to the cells and/or expression or activity of the recombinant polypeptide or protein in any number of other ways. Exemplary metabolic waste products include lactate, which is produced as a result of glucose metabolism, and ammonium, which is produced as a result of glutamine metabolism. One goal of the present invention is to slow production of, reduce or even eliminate metabolic waste products in mammalian cell cultures.

[00103] "Osmolarity" and "Osmolality": "Osmolality" is a measure of the osmotic pressure of dissolved solute particles in an aqueous solution. The solute particles include both ions and non-ionized molecules. Osmolality is expressed as the concentration of osmotically active particles (i.e., osmoles) dissolved in 1 kg of solution (1 mOsm/kg H_2O at 38°C is equivalent to an osmotic pressure of 19mm Hg). "Osmolarity," by contrast, refers to the number of solute particles dissolved in 1 liter of solution. When used herein, the abbreviation "mOsm" means "milliosmoles/kg solution".

[00104] "Perfusion culture": The term "perfusion culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which additional components are provided continuously or semi-continuously to the culture subsequent to the beginning of the culture process. The provided components typically comprise nutritional supplements for the cells which have been depleted during the culturing process. A portion of the cells and/or components in the medium are typically harvested on a continuous or semi-continuous basis and are optionally purified.

[00105] "Polypeptide": The term "polypeptide" as used herein refers a sequential chain of amino acids linked together via peptide bonds. The term is used to refer to an amino acid chain of any length, but one of ordinary skill in the art will understand that the term is not limited to lengthy chains and can refer to a minimal chain comprising two amino acids linked together via a peptide bond.

[00106] "Protein": The term "protein" as used herein refers to one or more polypeptides that function as a discrete unit. If a single polypeptide is the discrete functioning unit and does require permanent physical association with other polypeptides in order to form the discrete functioning unit, the terms "polypeptide" and "protein" as used herein are used interchangeably. If discrete functional unit is comprised of more than one polypeptide that physically associate with one another,

the term "protein" as used herein refers to the multiple polypeptides that are physically coupled and function together as the discrete unit.

[00107] "Recombinantly expressed polypeptide" and "Recombinant polypeptide": These terms as used herein refer to a polypeptide expressed from a mammalian host cell that has been genetically engineered to express that polypeptide. The recombinantly expressed polypeptide can be identical or similar to polypeptides that are normally expressed in the mammalian host cell. The recombinantly expressed polypeptide can also foreign to the host cell, i.e. heterologous to peptides normally expressed in the mammalian host cell. Alternatively, the recombinantly expressed polypeptide can be chimeric in that portions of the polypeptide contain amino acid sequences that are identical or similar to polypeptides normally expressed in the mammalian host cell, while other portions are foreign to the host cell.

[00108] "Seeding": The term "seeding" as used herein refers to the process of providing a cell culture to a bioreactor or another vessel. The cells may have been propagated previously in another bioreactor or vessel. Alternatively, the cells may have been frozen and thawed immediately prior to providing them to the bioreactor or vessel. The term refers to any number of cells, including a single cell.

[00109] "Titer": The term "titer" as used herein refers to the total amount of recombinantly expressed polypeptide or protein produced by a mammalian cell culture divided by a given amount of medium volume. Titer is typically expressed in units of milligrams of polypeptide or protein per milliliter of medium.

Detailed Description of Certain Preferred Embodiments

[00110] The present invention provides improved systems for the production of proteins and/or polypeptides by cell culture. In particular, the invention provides systems that minimize production of one or more metabolic products detrimental to cell growth, viability, and/or protein production or quality. In a preferred embodiment of the present invention, the cell culture is a batch or fed-batch culture. Other certain preferred embodiments of the invention are discussed in detail below. Those of ordinary skill in the art will understand, however, that various modifications to these preferred embodiments are within the scope of the appended claims. It is the claims and equivalents thereof that define the scope of the present

invention, which is not and should not be limited to or by this description of certain preferred embodiments.

Polypeptides

[00111] Any polypeptide that is expressible in a host cell may be produced in accordance with the present invention. The polypeptide may be expressed from a gene that is endogenous to the host cell, or from a gene that is introduced into the host cell through genetic engineering. The polypeptide may be one that occurs in nature, or may alternatively have a sequence that was engineered or selected by the hand of man. An engineered polypeptide may be assembled from other polypeptide segments that individually occur in nature, or may include one or more segments that are not naturally occurring.

[00112] Polypeptides that may desirably be expressed in accordance with the present invention will often be selected on the basis of an interesting biological or chemical activity. For example, the present invention may be employed to express any pharmaceutically or commercially relevant enzyme, receptor, antibody, hormone, regulatory factor, antigen, binding agent, etc.

Antibodies

[00113] Given the large number of antibodies currently in use or under investigation as pharmaceutical or other commercial agents, production of antibodies is of particular interest in accordance with the present invention. Antibodies are proteins that have the ability to specifically bind a particular antigen. Any antibody that can be expressed in a host cell may be used in accordance with the present invention. In a preferred embodiment, the antibody to be expressed is a monoclonal antibody.

[00114] In another preferred embodiment, the monoclonal antibody is a chimeric antibody. A chimeric antibody contains amino acid fragments that are derived from more than one organism. Chimeric antibody molecules can include, for example, an antigen binding domain from an antibody of a mouse, rat, or other species, with human constant regions. A variety of approaches for making chimeric antibodies have been described. *See e.g.*, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851 (1985); Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452 (1985), Cabilly *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,567; Boss *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,397; Tanaguchi *et al.*, European Patent

Publication EP171496; European Patent Publication 0173494, United Kingdom Patent GB 2177096B.

[00115] In another preferred embodiment, the monoclonal antibody is a human antibody derived, e.g., through the use of ribosome-display or phage-display libraries (*see, e.g.*, Winter *et al.*, U.S. Patent No. 6,291,159 and Kawasaki, U.S. Patent No. 5,658,754) or the use of xenographic species in which the native antibody genes are inactivated and functionally replaced with human antibody genes, while leaving intact the other components of the native immune system (*see, e.g.*, Kucherlapati *et al.*, U.S. Patent No. 6,657,103).

[00116] In another preferred embodiment, the monoclonal antibody is a humanized antibody. A humanized antibody is a chimeric antibody wherein the large majority of the amino acid residues are derived from human antibodies, thus minimizing any potential immune reaction when delivered to a human subject. In humanized antibodies, amino acid residues in the complementarity determining regions are replaced, at least in part, with residues from a non-human species that confer a desired antigen specificity or affinity. Such altered immunoglobulin molecules can be made by any of several techniques known in the art, (*e.g.*, Teng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 7308-7312 (1983); Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 4, 7279 (1983); Olsson *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 92, 3-16 (1982)), and are preferably made according to the teachings of PCT Publication WO92/06193 or EP 0239400, all of which are incorporated herein by reference). Humanized antibodies can be commercially produced by, for example, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain. For further reference, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992), all of which are incorporated herein by reference.

[00117] In another preferred embodiment, the monoclonal, chimeric, or humanized antibodies described above may contain amino acid residues that do not naturally occur in any antibody in any species in nature. These foreign residues can be utilized, for example, to confer novel or modified specificity, affinity or effector function on the monoclonal, chimeric or humanized antibody. In another preferred embodiment, the antibodies described above may be conjugated to drugs for systemic pharmacotherapy, such as toxins, low-molecular-weight cytotoxic drugs,

biological response modifiers, and radionuclides (see e.g., Kunz et al., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, US20040082764 A1).

[00118] In one embodiment, the antibody is an antibody that specifically binds to the Aβ fragment of amyloid precursor protein or to other components of an amyloid plaque, and is useful in combating the accumulation of amyloid plaques in the brain which characterize Alzheimer's disease. (See, e.g., US Provisional Application 60/636,684.)

[00119] In another embodiment, antibodies of the present invention are directed against cell surface antigens expressed on target cells and/or tissues in proliferative disorders such as cancer. In one embodiment, the antibody is an IgG1 anti-Lewis Y antibody. Lewis Y is a carbohydrate antigen with the structure Fucα1 → 2Galβ1 → 4[Fucα1 → 3]GlcNacβ1→3R (Abe et al. (1983) J. Biol. Chem., 258 11793-11797). Lewis Y antigen is expressed on the surface of 60% to 90% of human epithelial tumors (including those of the breast, colon, lung, and prostate), at least 40% of which overexpress this antigen, and has limited expression in normal tissues.

[00120] In order to target Ley and effectively target a tumor, an antibody with exclusive specificity to the antigen is ideally required. Thus, preferably, the anti-Lewis Y antibodies of the present invention do not cross-react with the type 1 structures (i.e., the lacto-series of blood groups (Lea and Leb)) and, preferably, do not bind other type 2 epitopes (i.e., neolacto-structure) like Lex and H-type 2 structures. An example of a preferred anti-Lewis Y antibody is designated hu3S193 (see U.S. Patent Nos. 6,310,185; 6,518,415; 5,874,060, incorporated herein in their entirety). The humanized antibody hu3S193 (Attia, M.A., et al. 1787-1800) was generated by CDR-grafting from 3S193, which is a murine monoclonal antibody raised against adenocarcinoma cell with exceptional specificity for Ley (Kitamura, K., 12957-12961). Hu3S193 not only retains the specificity of 3S193 for Ley but has also gained in the capability to mediate complement dependent cytotoxicity (hereinafter referred to as CDC) and antibody dependent cellular cytotoxicity (hereinafter referred to as ADCC) (Attia, M.A., et al. 1787-1800). This antibody targets Ley expressing xenografts in nude mice as demonstrated by biodistribution studies with hu3S193 labeled with 125I, 111In, or 18F, as well as other radiolabels that require a chelating agent, such as 111In, 99mTc, or 90Y (Clark, et al. 4804-4811).

[00121] In another embodiment, the antibody is one of the human anti-GDF-8 antibodies termed Myo29, Myo28, and Myo22, and antibodies and antigen- binding fragments derived therefrom. These antibodies are capable of binding mature GDF-8 with high affinity, inhibit GDF-8 activity *in vitro* and *in vivo* as demonstrated, for example, by inhibition of ActRIIB binding and reporter gene assays, and may inhibit GDF-8 activity associated with negative regulation of skeletal muscle mass and bone density. *See, e.g.,* Veldman, *et al*, U.S. Patent Application No. 20040142382.

Receptors

[00122] Another class of polypeptides that have been shown to be effective as pharmaceutical and/or commercial agents includes receptors. Receptors are typically trans-membrane glycoproteins that function by recognizing an extra-cellular signaling ligand. Receptors typically have a protein kinase domain in addition to the ligand recognizing domain, which initiates a signaling pathway by phosphorylating target intracellular molecules upon binding the ligand, leading to developmental or metabolic changes within the cell. In one embodiment, the receptors of interest are modified so as to remove the transmembrane and/or intracellular domain(s), in place of which there may optionally be attached an Ig-domain. In a preferred embodiment, receptors to be produced in accordance with the present invention are receptor tyrosine kinases (RTKs). The RTK family includes receptors that are crucial for a variety of functions numerous cell types (see, e.g., Yarden and Ullrich, *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478, 1988; Ullrich and Schlessinger, *Cell* 61:243-254, 1990, incorporated herein by reference). Non-limiting examples of RTKs include members of the fibroblast growth factor (FGF) receptor family, members of the epidermal growth factor receptor (EGF) family, platelet derived growth factor (PDGF) receptor, tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-1 (TIE-1) and TIE-2 receptors (Sato *et al., Nature* 376(6535):70-74 (1995), incorporated herein be reference) and c-Met receptor, some of which have been suggested to promote angiogenesis, directly or indirectly (Mustonen and Alitalo, *J. Cell Biol.* 129:895-898, 1995). Other non-limiting examples of RTK's include fetal liver kinase 1 (FLK-1) (sometimes referred to as kinase insert domain-containing receptor (KDR) (Terman et al., Oncogene 6:1677-83, 1991) or vascular endothelial cell growth factor receptor 2

(VEGFR-2)), fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) (DeVries et al. Science 255;989-991, 1992; Shibuya et al., Oncogene 5:519-524, 1990), sometimes referred to as vascular endothelial cell growth factor receptor 1 (VEGFR-1), neuropilin-1, endoglin, endosialin, and Axl. Those of ordinary skill in the art will be aware of other receptors that can preferably be expressed in accordance with the present invention.

[00123] In a particularly preferred embodiment, tumor necrosis factor inhibitors, in the form of tumor necrosis factor alpha and beta receptors (TNFR-1; EP 417,563 published Mar. 20, 1991; and TNFR-2, EP 417,014 published Mar. 20, 1991) are expressed in accordance with the present invention (for review, see Naismith and Sprang, *J Inflamm.* 47(1-2):1-7 (1995-96), incorporated herein by reference). According to one embodiment, the tumor necrosis factor inhibitor comprises a soluble TNF receptor and preferably a TNFR-Ig. In one embodiment, the preferred TNF inhibitors of the present invention are soluble forms of TNFRI and TNFRII, as well as soluble TNF binding proteins, in another embodiment, the TNFR-Ig fusion is a TNFR:Fc, a term which as used herein refers to "*etanercept*," which is a dimer of two molecules of the extracellular portion of the p75 TNF-.alpha. receptor, each molecule consisting of a 235 amino acid Fc portion of human IgG.sub.1.

Growth Factors and Other Signaling Molecules

[00124] Another class of polypeptides that have been shown to be effective as pharmaceutical and/or commercial agents includes growth factors and other signaling molecules. Growth factors are typically glycoproteins that are secreted by cells and bind to and activate receptors on other cells, initiating a metabolic or developmental change in the receptor cell. In one embodiment, the protein of interest is an ActRIIB fusion polypeptide comprising the extracellular domain of the ActRIIB receptor and the Fc portion of an antibody (see, e.g., Wolfman, et al., ActRIIB fusion polypeptides and uses therefor, US2004/0223966 A1). In another embodiment, the growth factor may be a modified GDF-8 propeptide (see., e.g., Wolfman, et al., Modified and stabilized GDF propeptides and uses thereof, US2003/0104406 A1). Alternatively, the protein of interest could be a follistatin-domain-containing protein (see, e.g., Hill, et al., GASP1: a follistatin domain containing protein, US 2003/0162714 A1, Hill, et al., GASP1: a follistatin domain

containing protein, US 2005/0106154 A1, Hill, et al., Follistatin domain containing proteins, US 2003/0180306 A1).

[00125] Non-limiting examples of mammalian growth factors and other signaling molecules include cytokines; epidermal growth factor (EGF); platelet-derived growth factor (PDGF); fibroblast growth factors (FGFs) such as aFGF and bFGF; transforming growth factors (TGFs) such as TGF-alpha and TGF-beta, including TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4, or TGF-beta 5; insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and IGF-II); des(1-3) -IGF-I (brain IGF-I), insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins such as CD-3, CD-4, CD-8, and CD-19; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein (BMP); an interferon such as interferon-alpha, -beta, and -gamma; colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, and G-CSF; interleukins (ILs), e.g., IL-1 to IL-10; tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta; insulin A-chain; insulin B-chain; proinsulin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; clotting factors such as factor VIIIC, factor IX, tissue factor, and von Willebrands factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator, such as urokinase or human urine or tissue-type plasminogen activator (t-PA); bombesin; thrombin, hemopoietic growth factor; enkephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); human macrophage inflammatory protein (MIP-1-alpha); mullerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; prorelaxin; mouse gonadotropin-associated peptide; neurotrophic factors such as bone-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5, or -6 (NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor such as NGF-beta. One of ordinary skill in the art will be aware of other growth factors or signaling molecules that can be expressed in accordance with the present invention.

G-Protein Coupled Receptors

[00126] Another class of polypeptides that have been shown to be effective as pharmaceutical and/or commercial agents includes growth factors and other signaling molecules. G-protein coupled receptors (GPCRs) are proteins that have seven transmembrane domains. Upon binding of a ligand to a GPCR, a signal is

transduced within the cell which results in a change in a biological or physiological property of the cell.

[00127] GPCRs, along with G-proteins and effectors (intracellular enzymes and channels which are modulated by G-proteins), are the components of a modular signaling system that connects the state of intracellular second messengers to extracellular inputs. These genes and gene-products are potential causative agents of disease.

[00128] Specific defects in the rhodopsin gene and the V2 vasopressin receptor gene have been shown to cause various forms of autosomal dominant and autosomal recessive retinitis pigmentosa, nephrogenic diabetes insipidus. These receptors are of critical importance to both the central nervous system and peripheral physiological processes. The GPCR protein superfamily now contains over 250 types of paralogues, receptors that represent variants generated by gene duplications (or other processes), as opposed to orthologues, the same receptor from different species. The superfamily can be broken down into five families: Family I, receptors typified by rhodopsin and the beta2-adrenergic receptor and currently represented by over 200 unique members; Family II, the recently characterized parathyroid hormone/calcitonin/secretin receptor family; Family III, the metabotropic glutamate receptor family in mammals; Family IV, the cAMP receptor family, important in the chemotaxis and development of D. discoideum; and Family V, the fungal mating pheromone receptors such as STE2.

[00129] GPCRs include receptors for biogenic amines, for lipid mediators of inflammation, peptide hormones, and sensory signal mediators. The GPCR becomes activated when the receptor binds its extracellular ligand. Conformational changes in the GPCR, which result from the ligand-receptor interaction, affect the binding affinity of a G protein to the GPCR intracellular domains. This enables GTP to bind with enhanced affinity to the G protein.

[00130] Activation of the G protein by GTP leads to the interaction of the G protein α subunit with adenylate cyclase or other second messenger molecule generators. This interaction regulates the activity of adenylate cyclase and hence production of a second messenger molecule, cAMP. cAMP regulates phosphorylation and activation of other intracellular proteins. Alternatively, cellular levels of other second messenger molecules, such as cGMP or eicosinoids, may be

upregulated or downregulated by the activity of GPCRs. The G protein α subunit is deactivated by hydrolysis of the GTP by GTPase, and the α, β, and γ subunits reassociate. The heterotrimeric G protein then dissociates from the adenylate cyclase or other second messenger molecule generator. Activity of GPCR may also be regulated by phosphorylation of the intra- and extracellular domains or loops.

[00131] *Glutamate receptors form a group of GPCRs that are important in* neurotransmission. Glutamate is the major neurotransmitter in the CNS and is believed to have important roles in neuronal plasticity, cognition, memory, learning and some neurological disorders such as epilepsy, stroke, and neurodegeneration (Watson, S. and S. Arkinstall (1994) The G- Protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, pp. 130-132). These effects of glutamate are mediated by two distinct classes of receptors termed ionotropic and metabotropic. Ionotropic receptors contain an intrinsic cation channel and mediate fast excitatory actions of glutamate. Metabotropic receptors are modulatory, increasing the membrane excitability of neurons by inhibiting calcium dependent potassium conductances and both inhibiting and potentiating excitatory transmission of ionotropic receptors. Metabotropic receptors are classified into five subtypes based on agonist pharmacology and signal transduction pathways and are widely distributed in brain tissues.

[00132] The vasoactive intestinal polypeptide (VIP) family is a group of related polypeptides whose actions are also mediated by GPCRs. Key members of this family are VIP itself, secretin, and growth hormone releasing factor (GRF). VIP has a wide profile of physiological actions including relaxation of smooth muscles, stimulation or inhibition of secretion in various tissues, modulation of various immune cell activities, and various excitatory and inhibitory activities in the CNS. Secretin stimulates secretion of enzymes and ions in the pancreas and intestine and is also present in small amounts in the brain. GRF is an important neuroendocrine agent regulating synthesis and release of growth hormone from the anterior pituitary (Watson, S. and S. Arkinstall supra, pp. 278-283).

[00133] Following ligand binding to the GPCR, a conformational change is transmitted to the G protein, which causes the α-subunit to exchange a bound GDP molecule for a GTP molecule and to dissociate from the βγ-subunits. The GTP-bound form of the α-subunit typically functions as an effector-modulating moiety,

leading to the production of second messengers, such as cyclic AMP (e.g., by activation of adenylate cyclase), diacylglycerol or inositol phosphates. Greater than 20 different types of α-subunits are known in man, which associate with a smaller pool of β and γ subunits. Examples of mammalian G proteins include Gi, Go, Gq, Gs and Gt. G proteins are described extensively in Lodish H. et al. Molecular Cell Biology, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995), the contents of which is incorporated herein by reference.

[00134] GPCRs are a major target for drug action and development. In fact, receptors have led to more than half of the currently known drugs (Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14: 1516) and GPCRs represent the most important target for therapeutic intervention with 30% of clinically prescribed drugs either antagonizing or agonizing a GPCR (Milligan, G. and Rees, S., (1999) TIPS, 20: 118-124). This demonstrates that these receptors have an established, proven history as therapeutic targets.

[00135] In general, practitioners of the present invention will selected their polypeptide of interest, and will know its precise amino acid sequence. The techniques of the present invention have been successfully applied to production of diverse polypeptides including, for example, a human monoclonal antibody directed to growth and differentiation factor 8 (Examples 1, 3, 4, 7-14), humanized anti-Lewis Y antibody (Examples 5 and 6), anti-ABeta (Example 15) and a dimeric Fc-fusion protein of tumor necrosis factor receptor (Example 16), indicating that the present invention will be useful for expression of a variety of different polypeptides and proteins. Any given protein that is to be expressed in accordance with the present invention will have its own idiosyncratic characteristics and may influence the cell density or viability of the cultured cells, and may be expressed at lower levels than another polypeptide or protein grown under identical culture conditions. One of ordinary skill in the art will be able to appropriately modify the steps and compositions of the present invention in order to optimize cell growth and/or production of any given expressed polypeptide or protein.

Genetic Control Elements

[00136] As will be clear to those of ordinary skill in the art, genetic control elements may be employed to regulate gene expression of the polypeptide or

protein. Such genetic control elements should be selected to be active in the relevant host cell. Control elements may be constitutively active or may be inducible under defined circumstances. Inducible control elements are particularly useful when the expressed protein is toxic or has otherwise deleterious effects on cell growth and/or viability. In such instances, regulating expression of the polypeptide or protein through inducible control elements may improve cell viability, cell density, and /or total yield of the expressed polypeptide or protein. A large number of control elements useful in the practice of the present invention are known and available in the art.

[00137] Representative constitutive mammalian promoters that may be used in accordance with the present invention include, but are not limited to, the hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPTR) promoter, the adenosine deaminase promoter, the pyruvate kinase promoter, the beta-actin promoter as well as other constitutive promoters known to those of ordinary skill in the art. Additionally, viral promoters that have been shown to drive constitutive expression of coding sequences in eukaryotic cells include, for example, simian virus promoters, herpes simplex virus promoters, papilloma virus promoters, adenovirus promoters, human immunodeficiency virus (HIV) promoters, Rous sarcoma virus promoters, cytomegalovirus (CMV) promoters, the long terminal repeats (LTRs) of Moloney murine leukemia virus and other retroviruses, the thymidine kinase promoter of herpes simplex virus as well as other viral promoters known to those of ordinary skill in the art.

[00138] Inducible promoters drive expression of operably linked coding sequences in the presence of an inducing agent and may also be used in accordance with the present invention. For example, in mammalian cells, the metallothionein promoter is induces transcription of downstream coding sequences in the presence of certain metal ions. Other inducible promoters will be recognized by and/or known to those of ordinary skill in the art.

[00139] In general, the gene expression sequence will also include 5' non-transcribing and 5' non-translating sequences involved with the initiation of transcription and translation, respectively, such as a TATA box, capping sequence, CAAT sequence, and the like. Enhancer elements can optionally be used to increase expression levels of the polypeptides or proteins to be expressed. Examples of enhancer elements that have been shown to function in mammalian cells include

the SV40 early gene enhancer, as described in Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4: 761 and the enhancer/promoter derived from the long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (RSV), as described in Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777 and human cytomegalovirus, as described in Boshart et al., Cell (1985) 41:521.

[00140] Systems for linking control elements to coding sequences are well known in the art (general molecular biological and recombinant DNA techniques are described in Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, which is incorporated herein by reference). Commercial vectors suitable for inserting preferred coding sequence for expression in various mammalian cells under a variety of growth and induction conditions are also well known in the art.

Introduction of coding sequences and related control elements into host cells

[00141] Methods suitable for introducing into mammalian host cells nucleic acids sufficient to achieve expression of the polypeptides or proteins of interest are well known in the art. See, for example, Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117,060; and EP 117,058, all incorporated herein by reference.

[00142] For mammalian cells, preferred methods of transformation include the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Erb, *Virology*, 52:456-457 (1978) or the lipofectamine™. (Gibco BRL) Method of Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1193). General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel in U.S. Pat. No. 4,399,216 issued Aug. 16, 1983. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., *Methods in Enzymology* (1989), Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), and Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988). Non-limiting representative examples of suitable vectors for expression of polypeptides or proteins in mammalian cells include pCDNA1; pCD, see Okayama, et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMClneo Poly-A, see Thomas, et al. (1987) *Cell* 51:503-512; and a baculovirus vector such as pAC 373 or pAC 610.

[00143] In preferred embodiments, the polypeptide or protein is stably transfected into the host cell. However, one of ordinary skill in the art will

recognize that the present invention can be used with either transiently or stably transfected mammalian cells.

Cells

[00144] Any mammalian cell or cell type susceptible to cell culture, and to expression of polypeptides, may be utilized in accordance with the present invention. Non-limiting examples of mammalian cells that may be used in accordance with the present invention include BALB/c mouse myeloma line (NSO/1, ECACC No: 85110503); human retinoblasts (PER.C6 (CruCell, Leiden, The Netherlands)); monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); Chinese hamster ovary cells +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1 587); human cervical carcinoma cells (HeLa, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2). In a particularly preferred embodiment, the present invention is used in the culturing of and expression of polypeptides and proteins from CHO cell lines.

[00145] Additionally, any number of commercially and non-commercially available hybridoma cell lines that express polypeptides or proteins may be utilized in accordance with the present invention. One skilled in the art will appreciate that hybridoma cell lines might have different nutrition requirements and/or might require different culture conditions for optimal growth and polypeptide or protein expression, and will be able to modify conditions as needed.

[00146] As noted above, in many instances the cells will be selected or engineered to produce high levels of protein or polypeptide. Often, cells are genetically engineered to produce high levels of protein, for example by introduction of a gene encoding the protein or polypeptide of interest and/or by

introduction of control elements that regulate expression of the gene (whether endogenous or introduced) encoding the polypeptide of interest.

[00147] Certain polypeptides may have detrimental effects on cell growth, cell viability or some other characteristic of the cells that ultimately limits production of the polypeptide or protein of interest in some way. Even amongst a population of cells of one particular type engineered to express a specific polypeptide, variability within the cellular population exists such that certain individual cells will grow better and/or produce more polypeptide of interest. In certain preferred embodiments of the present invention, the cell line is empirically selected by the practitioner for robust growth under the particular conditions chosen for culturing the cells. In particularly preferred embodiments, individual cells engineered to express a particular polypeptide are chosen for large-scale production based on cell growth, final cell density, percent cell viability, titer of the expressed polypeptide or any combination of these or any other conditions deemed important by the practitioner.

Cell Culture Phase

[00148] Typical procedures for producing a polypeptide of interest include batch cultures and fed-batch cultures. Batch culture processes traditionally comprise inoculating a large-scale production culture with a seed culture of a particular cell density, growing the cells under conditions conducive to cell growth and viability, harvesting the culture when the cells reach a specified cell density, and purifying the expressed polypeptide. Fed-batch culture procedures include an additional step or steps of supplementing the batch culture with nutrients and other components that are consumed during the growth of the cells. A persistent and unsolved problem with traditional batch and fed-batch cultures is the production of metabolic waste products, which have detrimental effects on cell growth, viability, and production of expressed polypeptides. Two metabolic waste products that have particularly detrimental effects are lactate and ammonium, which are produced as a result of glucose and glutamine metabolism, respectively. In addition to the enzymatic production of ammonium as a result of glutamine metabolism, ammonium also accumulates in cell cultures as a result of non-metabolic degradation over time. The present invention provides an improved method of large-scale production of polypeptides that minimizes the detrimental effects of ammonium and lactate by

slowing and even reversing the accumulation of these waste products in cell cultures. One of ordinary skill in the art will recognize that the present invention can be employed in any system in which cells are cultured including, but not limited to, batch, fed-batch and perfusion systems. In certain preferred embodiments of the present invention, the cells are grown in batch or fed-batch systems.

Media

[00149] Traditional media formulations, including commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ([DMEM], Sigma), have contained relatively high levels of glucose and glutamine in comparison to other amino acids. These components have been thought to be required in abundance since they are the primary metabolic energy sources for the cells. However, rapid consumption of these nutrients leads to the accumulation of lactate and ammonium as described above. Additionally, high initial levels of glucose and glutamine and the subsequent accumulation of lactate and ammonium result in high osmolarity, a condition that by itself is often detrimental to cell growth, cell viability and the production of polypeptides.

[00150] The present invention provides a variety of media formulations that, when used in accordance with other culturing steps described herein, minimize and even reverse accumulation of lactate and ammonium. Media formulations of the present invention that have been shown to have beneficial effects on cell growth and/or viability or on expression of polypeptide or protein include one or more of: i) a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and v) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume greater than about 16 mM. One of ordinary skill in the art will understand that "cumulative", as used above, refers to the total amount of a particular component or components added over the course of the cell culture, including components added at the beginning of the culture and subsequently added components. One of ordinary skill in the art will understand that the media

formulations of the present invention encompass both defined and non-defined media.

[00151] Traditional media formulations begin with a relatively low level of total amino acids in comparison with the media formulations of the present invention. For example, the traditional cell culture medium known as DME-F12 (a 50:50 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's medium and Ham's F12 medium) has a total amino acid content of 7.29 mM, and the traditional cell culture medium known as RPMI-1640 has a total amino acid content of 6.44 mM (See e.g., H.J. Morton, In Vitro, 6:89-108 (1970), R.G. Ham, Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA), 53:288-293 (1965), G.E. Moore *et al.*, J. Am. Medical Assn., 199:519-24 (1967), all incorporated herein by reference). In certain embodiments of the present invention, the amino acid concentration in the culture media is preferably greater than about 70 mM. More preferably still, the media formulations of the present invention contain amino acid concentrations greater than about 70 mM in the starting media. It has been shown that when amino acid concentrations of the starting media are in this range, cell density and titer are increased throughout the growth period of the culture (see Example 13).

[00152] Additionally, in certain embodiments of the present invention, the molar ratio of glutamine to asparagine in the culture media is reduced compared to other commercially and non-commercially available media. Preferably the molar ratio of glutamine to asparagine in the culture media is less than about two.

[00153] Additionally, in certain embodiments of the present invention, the molar ratio of glutamine to total amino acids in the culture media is reduced compared to other commercially and non-commercially available media. Preferably the molar ratio of glutamine to total amino acids in the culture media less than about 0.2.

[00154] An interesting and unexpected result of lowering the molar ratio of glutamine to asparagine or to the total concentration of amino acids in the starting media according to the present invention was that in addition to an observed decrease in the accumulation of ammonium, a decrease in the accumulation of lactate was seen as well. In certain embodiments, the accumulated levels of ammonium and lactate are not only lower than those in control cultures, but in fact actually decrease after an initial accumulation (for example, see Examples 3 and 7).

[00155] Boraston (US Patent Number 5,871,999) has disclosed a culture medium in which the molar ratio of total inorganic ions to total amino acids is between 1 and

10. Boraston showed that by providing culture medium in which the molar ratio of total inorganic ions to total amino acids is in this range, aggregation of CHO cells grown in the medium is decreased. In another preferred embodiment of the present invention, the molar ratio of total inorganic ions to total amino acids in the culture medium is reduced even further, to between about 0.4 to 1. As shown in Example 13, reducing this ratio from 1.75 to approximately 0.7 results in a marked increase in cell density and production of expressed polypeptide or protein throughout the growth period of the culture.

[00156] In another preferred embodiment of the present invention, the culture medium contains a combined glutamine and asparagine concentration of between about 16 and 36 mM. As shown in Example 14, Table 22, media which contain a combined total concentration of glutamine and asparagine within this range exhibit higher titers of expressed polypeptide than media which contain a combined total glutamine and asparagine outside this range. One of ordinary skill in the art will be able to choose the exact combined glutamine and asparagine concentration within this range in order to optimize cell growth and/or viability and to maximize the production of the expressed polypeptide.

[00157] Furthermore, one of ordinary skill in the art will recognize that any of the conditions listed above may be used either singly or in various combinations with one another. By utilizing media formulation which exhibit one, some or all of the above characteristics, one of ordinary skill in the art will be able to optimize cell growth and/or viability and to maximize the production of the expressed polypeptide.

[00158] Any of these media formulations disclosed in the present invention may optionally be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors, particular ions (such as sodium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers, vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), amino acids, lipids, protein hydrolysates, or glucose or other energy source. In certain embodiments of the present invention, it may be beneficial to supplement the media with chemical inductants such as hexamethylene-bis(acetamide) ("HMBA") and sodium butyrate ("NaB"). These optional supplements may be added at the beginning of the culture or may be added at a later point in order to replenish depleted nutrients or for

another reason. One of ordinary skill in the art will be aware of any desirable or necessary supplements that may be included in the disclosed media formulations.

Providing a mammalian cell culture

[00159] Various methods of preparing mammalian cells for production of proteins or polypeptides by batch and fed-batch culture are well known in the art. As described above, a nucleic acid sufficient to achieve expression (typically a vector containing the gene encoding the polypeptide or protein of interest and any operably linked genetic control elements) may be introduced into the host cell line by any number of well-known techniques. Typically, cells are screened to determine which of the host cells have actually taken up the vector and express the polypeptide or protein of interest. Traditional methods of detecting a particular polypeptide or protein of interest expressed by mammalian cells include but are not limited to immunohistochemistry, immunoprecipitation, flow cytometry, immunofluorescence microscopy, SDS-PAGE, Western blots, enzyme-linked immunosorbentassay (ELISA), high performance liquid chromatography (HPLC) techniques, biological activity assays and affinity chromatography. One of ordinary skill in the art will be aware of other appropriate techniques for detecting expressed polypeptides or proteins. If multiple host cells express the polypeptide or protein of interest, some or all of the listed techniques can be used to determine which of the cells expresses that polypeptide or protein at the highest levels.

[00160] Once a cell that expresses the polypeptide or protein of interest has been identified, the cell is propagated in culture by any of the variety of methods well-known to one of ordinary skill in the art. The cell expressing the polypeptide or protein of interest is typically propagated by growing it at a temperature and in a medium that is conducive to the survival, growth and viability of the cell. The initial culture volume can be of any size, but is often smaller than the culture volume of the production bioreactor used in the final production of the polypeptide or protein of interest, and frequently cells are passaged several times in bioreactors of increasing volume prior to seeding the production bioreactor. The cell culture can be agitated or shaken to increase oxygenation of the medium and dispersion of nutrients to the cells. Alternatively or additionally, special sparging devices that are well known in the art can be used to increase and control oxygenation of the culture. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will

understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of the bioreactor, including but not limited to pH, temperature, oxygenation, etc.

[00161] The starting cell density in the production bioreactor can be chosen by one of ordinary skill in the art. In accordance with the present invention, the starting cell density in the production bioreactor can be as low as a single cell per culture volume. In preferred embodiments of the present invention, starting cell densities in the production bioreactor can range from about 2×10^2 viable cells per mL to about 2×10^3, 2×10^4, 2×10^5, 2×10^6, 5×10^6 or 10×10^6 viable cells per mL and higher.

[00162] Initial and intermediate cell cultures may be grown to any desired density before seeding the next intermediate or final production bioreactor. It is preferred that most of the cells remain alive prior to seeding, although total or near total viability is not required. In one embodiment of the present invention, the cells may be removed from the supernatant, for example, by low-speed centrifugation. It may also be desirable to wash the removed cells with a medium before seeding the next bioreactor to remove any unwanted metabolic waste products or medium components. The medium may be the medium in which the cells were previously grown or it may be a different medium or a washing solution selected by the practitioner of the present invention.

[00163] The cells may then be diluted to an appropriate density for seeding the production bioreactor. In a preferred embodiment of the present invention, the cells are diluted into the same medium that will be used in the production bioreactor. Alternatively, the cells can be diluted into another medium or solution, depending on the needs and desires of the practitioner of the present invention or to accommodate particular requirements of the cells themselves, for example, if they are to be stored for a short period of time prior to seeding the production bioreactor.

Initial Growth Phase

[00164] Once the production bioreactor has been seeded as described above, the cell culture is maintained in the initial growth phase under conditions conducive to the survival, growth and viability of the cell culture. The precise conditions will vary depending on the cell type, the organism from which the cell was derived, and the nature and character of the expressed polypeptide or protein.

[00165] In accordance with the present invention, the production bioreactor can be any volume that is appropriate for large-scale production of polypeptides or proteins. In a preferred embodiment, the volume of the production bioreactor is at least 500 liters. In other preferred embodiments, the volume of the production bioreactor is 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000 liters or more, or any volume in between. One of ordinary skill in the art will be aware of and will be able to choose a suitable bioreactor for use in practicing the present invention. The production bioreactor may be constructed of any material that is conducive to cell growth and viability that does not interfere with expression or stability of the produced polypeptide or protein.

[00166] The temperature of the cell culture in the initial growth phase will be selected based primarily on the range of temperatures at which the cell culture remains viable. For example, during the initial growth phase, CHO cells grow well at 37°C. In general, most mammalian cells grow well within a range of about 25°C to 42°C. Preferably, mammalian cells grow well within the range of about 35°C to 40°C. Those of ordinary skill in the art will be able to select appropriate temperature or temperatures in which to grow cells, depending on the needs of the cells and the production requirements of the practitioner.

[00167] In one embodiment of the present invention, the temperature of the initial growth phase is maintained at a single, constant temperature. In another embodiment, the temperature of the initial growth phase is maintained within a range of temperatures. For example, the temperature may be steadily increased or decreased during the initial growth phase. Alternatively, the temperature may be increased or decreased by discrete amounts at various times during the initial growth phase. One of ordinary skill in the art will be able to determine whether a single or multiple temperatures should be used, and whether the temperature should be adjusted steadily or by discrete amounts.

[00168] The cells may be grown during the initial growth phase for a greater or lesser amount of time, depending on the needs of the practitioner and the requirement of the cells themselves. In one embodiment, the cells are grown for a period of time sufficient to achieve a viable cell density that is a given percentage of the maximal viable cell density that the cells would eventually reach if allowed to grow undisturbed. For example, the cells may be grown for a period of time sufficient to achieve a desired viable cell density of 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,

45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or 99 percent of maximal viable cell density.

[00169] In another embodiment the cells are allowed to grow for a defined period of time. For example, depending on the starting concentration of the cell culture, the temperature at which the cells are grown, and the intrinsic growth rate of the cells, the cells may be grown for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more days. In some cases, the cells may be allowed to grow for a month or more. The cells would be grown for 0 days in the production bioreactor if their growth in a seed bioreactor, at the initial growth phase temperature, was sufficient that the viable cell density in the production bioreactor at the time of its inoculation is already at the desired percentage of the maximal viable cell density. The practitioner of the present invention will be able to choose the duration of the initial growth phase depending on polypeptide or protein production requirements and the needs of the cells themselves.

[00170] The cell culture may be agitated or shaken during the initial culture phase in order to increase oxygenation and dispersion of nutrients to the cells. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of the bioreactor during the initial growth phase, including but not limited to pH, temperature, oxygenation, etc. For example, pH can be controlled by supplying an appropriate amount of acid or base and oxygenation can be controlled with sparging devices that are well known in the art.

Shifting Culture Conditions

[00171] In accordance with the teaching of the present invention, at the end of the initial growth phase, at least one of the culture conditions may be shifted so that a second set of culture conditions is applied and a metabolic shift occurs in the culture. The accumulation of inhibitory metabolites, most notably lactate and ammonia, inhibits growth. A metabolic shift, accomplished by, e.g., a change in the temperature, pH, osmolality or chemical inductant level of the cell culture, may be characterized by a reduction in the ratio of a specific lactate production rate to a specific glucose consumption rate. In one non-limiting embodiment, the culture conditions are shifted by shifting the temperature of the culture. However, as is known in the art, shifting temperature is not the only mechanism through which an

appropriate metabolic shift can be achieved. For example, such a metabolic shift can also be achieved by shifting other culture conditions including, but not limited to, pH, osmolality, and sodium butyrate levels. As discussed above, the timing of the culture shift will be determined by the practitioner of the present invention, based on polypeptide or protein production requirements or the needs of the cells themselves.

[00172] When shifting the temperature of the culture, the temperature shift may be relatively gradual. For example, it may take several hours or days to complete the temperature change. Alternatively, the temperature shift may be relatively abrupt. For example, the temperature change may be complete in less than several hours. Given the appropriate production and control equipment, such as is standard in the commercial large-scale production of polypeptides or proteins, the temperature change may even be complete within less than an hour.

[00173] The temperature of the cell culture in the subsequent growth phase will be selected based primarily on the range of temperatures at which the cell culture remains viable and expresses recombinant polypeptides or proteins at commercially adequate levels. In general, most mammalian cells remain viable and express recombinant polypeptides or proteins at commercially adequate levels within a range of about 25°C to 42°C. Preferably, mammalian cells remain viable and express recombinant polypeptides or proteins at commercially adequate levels within a range of about 25°C to 35°C. Those of ordinary skill in the art will be able to select appropriate temperature or temperatures in which to grow cells, depending on the needs of the cells and the production requirements of the practitioner.

[00174] In one embodiment of the present invention, the temperature of the subsequent growth phase is maintained at a single, constant temperature. In another embodiment, the temperature of the subsequent growth phase is maintained within a range of temperatures. For example, the temperature may be steadily increased or decreased during the subsequent growth phase. Alternatively, the temperature may be increased or decreased by discrete amounts at various times during the subsequent growth phase. One of ordinary skill in the art will understand that multiple discrete temperature shifts are encompassed in this embodiment. For example, the temperature may be shifted once, the cells maintained at this temperature or temperature range for a certain period of time, after which the temperature may be shifted again -- either to a higher or lower temperature. The

temperature of the culture after each discrete shift may be constant or may be maintained within a certain range of temperatures.

[00175] In Example 16, data are shown that demonstrate the efficacy of employing two successive temperature changes, although it will be understood by those of ordinary skill in the art that in accordance with the present invention, three or more successive temperature changes may be used to increase cell viability or density and/or increase expression of recombinant polypeptides or proteins. The temperature or temperature ranges of the cell culture after each successive temperature shift may be higher or lower than the temperature(s) or temperature range(s) preceding the shift. In a preferred embodiment of the present invention, each successive temperature or temperature range is lower than the preceding temperature or temperature range.

Subsequent Production Phase

[00176] In accordance with the present invention, once the conditions of the cell culture have been shifted as discussed above, the cell culture is maintained for a subsequent production phase under a second set of culture conditions conducive to the survival and viability of the cell culture and appropriate for expression of the desired polypeptide or protein at commercially adequate levels.

[00177] As discussed above, the culture may be shifted by shifting one or more of a number of culture conditions including, but not limited to, temperature, pH, osmolality, and sodium butyrate levels. In one embodiment, the temperature of the culture is shifted. According to this embodiment, during the subsequent production phase, the culture is maintained at a temperature or temperature range that is lower than the temperature or temperature range of the initial growth phase. For example, during the subsequent production phase, CHO cells express recombinant polypeptides and proteins well within a range of 25°C to 35°C. As discussed above, multiple discrete temperature shifts may be employed to increase cell density or viability or to increase expression of the recombinant polypeptide or protein.

[00178] In accordance with the present invention, the cells may be maintained in the subsequent production phase until a desired cell density or production titer is reached. In one embodiment, the cells are maintained in the subsequent production phase until the titer to the recombinant polypeptide or protein reaches a maximum. In other embodiments, the culture may be harvested prior to this point, depending

on the production requirement of the practitioner or the needs of the cells themselves. For example, the cells may be maintained for a period of time sufficient to achieve a viable cell density of 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or 99 percent of maximal viable cell density. In some cases, it may be desirable to allow the viable cell density to reach a maximum, and then allow the viable cell density to decline to some level before harvesting the culture. In an extreme example, it may be desirable to allow the viable cell density to approach or reach zero before harvesting the culture.

[00179] In another embodiment of the present invention, the cells are allowed to grow for a defined period of time during the subsequent production phase. For example, depending on the concentration of the cell culture at the start of the subsequent growth phase, the temperature at which the cells are grown, and the intrinsic growth rate of the cells, the cells may be grown for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more days. In some cases, the cells may be allowed to grow for a month or more. The practitioner of the present invention will be able to choose the duration of the subsequent production phase depending on polypeptide or protein production requirements and the needs of the cells themselves.

[00180] In certain cases, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture during the subsequent production phase with nutrients or other medium components that have been depleted or metabolized by the cells. For example, it might be advantageous to supplement the cell culture with nutrients or other medium components observed to have been depleted during monitoring of the cell culture (see 'Monitoring Culture Conditions' section below). Alternatively or additionally, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture prior to the subsequent production phase. As non-limiting examples, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture with hormones and/or other growth factors, particular ions (such as sodium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers, vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), amino acids, lipids, or glucose or other energy source.

[00181] These supplementary components may all be added to the cell culture at one time, or they may be provided to the cell culture in a series of additions. In one embodiment of the present invention, the supplementary components are provided

to the cell culture at multiple times in proportional amounts. In another embodiment, it may be desirable to provide only certain of the supplementary components initially, and provide the remaining components at a later time. In yet another embodiment of the present invention, the cell culture is fed continually with these supplementary components.

[00182] In accordance with the present invention, the total volume added to the cell culture should optimally be kept to a minimal amount. For example, the total volume of the medium or solution containing the supplementary components added to the cell culture may be 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50% of the volume of the cell culture prior to providing the supplementary components.

[00183] The cell culture may be agitated or shaken during the subsequent production phase in order to increase oxygenation and dispersion of nutrients to the cells. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of the bioreactor during the subsequent growth phase, including but not limited to pH, temperature, oxygenation, etc. For example, pH can be controlled by supplying an appropriate amount of acid or base and oxygenation can be controlled with sparging devices that are well known in the art.

Monitoring culture conditions

[00184] In certain embodiments of the present invention, the practitioner may find it beneficial or necessary to periodically monitor particular conditions of the growing cell culture. Monitoring cell culture conditions allows the practitioner to determine whether the cell culture is producing recombinant polypeptide or protein at suboptimal levels or whether the culture is about to enter into a suboptimal production phase. In order to monitor certain cell culture conditions, it will be necessary to remove small aliquots of the culture for analysis. One of ordinary skill in the art will understand that such removal may potentially introduce contamination into the cell culture, and will take appropriate care to minimize the risk of such contamination.

[00185] As non-limiting example, it may be beneficial or necessary to monitor temperature, pH, cell density, cell viability, integrated viable cell density, lactate levels, ammonium levels, osmolarity, or titer of the expressed polypeptide or

protein. Numerous techniques are well known in the art that will allow one of ordinary skill in the art to measure these conditions. For example, cell density may be measured using a hemacytometer, a Coulter counter, or Cell density examination (CEDEX). Viable cell density may be determined by staining a culture sample with Trypan blue. Since only dead cells take up the Trypan blue, viable cell density can be determined by counting the total number of cells, dividing the number of cells that take up the dye by the total number of cells, and taking the reciprocal. HPLC can be used to determine the levels of lactate, ammonium or the expressed polypeptide or protein. Alternatively, the level of the expressed polypeptide or protein can be determined by standard molecular biology techniques such as coomassie staining of SDS-PAGE gels, Western blotting, Bradford assays, Lowry assays, Biuret assays, and UV absorbance. It may also be beneficial or necessary to monitor the post-translational modifications of the expressed polypeptide or protein, including phosphorylation and glycosylation.

Isolation of Expressed Polypeptide

[00186] In general, it will typically be desirable to isolate and/or purify proteins or polypeptides expressed according to the present invention. In a preferred embodiment, the expressed polypeptide or protein is secreted into the medium and thus cells and other solids may be removed, as by centrifugation or filtering for example, as a first step in the purification process. This embodiment is particularly useful when used in accordance with the present invention, since the methods and compositions described herein result in increased cell viability. As a result, fewer cells die during the culture process, and fewer proteolytic enzymes are released into the medium which can potentially decrease the yield of the expressed polypeptide or protein.

[00187] Alternatively, the expressed polypeptide or protein is bound to the surface of the host cell. In this embodiment, the media is removed and the host cells expressing the polypeptide or protein are lysed as a first step in the purification process. Lysis of mammalian host cells can be achieved by any number of means well known to those of ordinary skill in the art, including physical disruption by glass beads and exposure to high pH conditions.

[00188] The polypeptide or protein may be isolated and purified by standard methods including, but not limited to, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity,

size exclusion, and hydroxyapatite chromatography), gel filtration, centrifugation, or differential solubility, ethanol precipitation or by any other available technique for the purification of proteins (See, e.g., Scopes, *Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition*, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. and Hames, B.D. (eds.), *Protein Expression : A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; and Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), *Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology* (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997, all incorporated herein by reference). For immunoaffinity chromatography in particular, the protein may be isolated by binding it to an affinity column comprising antibodies that were raised against that protein and were affixed to a stationary support. Alternatively, affinity tags such as an influenza coat sequence, poly-histidine, or glutathione-S-transferase can be attached to the protein by standard recombinant techniques to allow for easy purification by passage over the appropriate affinity column. Protease inhibitors such as phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, pepstatin or aprotinin may be added at any or all stages in order to reduce or eliminate degradation of the polypeptide or protein during the purification process. Protease inhibitors are particularly desired when cells must be lysed in order to isolate and purify the expressed polypeptide or protein. One of ordinary skill in the art will appreciate that the exact purification technique will vary depending on the character of the polypeptide or protein to be purified, the character of the cells from which the polypeptide or protein is expressed, and the composition of the medium in which the cells were grown.

Pharmaceutical Formulations

[00189] In certain preferred embodiments of the invention, produced polypeptides or proteins will have pharmacologic activity and will be useful in the preparation of pharmaceuticals. Inventive compositions as described above may be administered to a subject or may first be formulated for delivery by any available route including, but not limited to parenteral (e.g., intravenous), intradermal, subcutaneous, oral, nasal, bronchial, opthalmic, transdermal (topical), transmucosal, rectal, and vaginal routes. Inventive pharmaceutical compositions typically include a purified polypeptide or protein expressed from a mammalian cell line, a delivery agent (i.e., a cationic polymer, peptide molecular transporter, surfactant, etc., as described above) in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. As

used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" includes solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

[00190] A pharmaceutical composition is formulated to be compatible with its intended route of administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

[00191] Pharmaceutical compositions suitable for injectable use typically include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition should be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. Preferred pharmaceutical formulations are stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. In general, the relevant carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethelene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will

be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

[00192] Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the purified polypeptide or protein in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the purified polypeptide or protein expressed from a mammalian cell line into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

[00193] Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. For the purpose of oral therapeutic administration, the purified polypeptide or protein can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules, e.g., gelatin capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring. Formulations for oral delivery may advantageously incorporate agents to improve stability within the gastrointestinal tract and/or to enhance absorption.

[00194] For administration by inhalation, the inventive compositions comprising a purified polypeptide or protein expressed from a mammalian cell line and a delivery agent are preferably delivered in the form of an aerosol spray from a pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer. The present invention particularly

contemplates delivery of the compositions using a nasal spray, inhaler, or other direct delivery to the upper and/or lower airway. Intranasal administration of DNA vaccines directed against influenza viruses has been shown to induce CD8 T cell responses, indicating that at least some cells in the respiratory tract can take up DNA when delivered by this route, and the delivery agents of the invention will enhance cellular uptake. According to certain embodiments of the invention the compositions comprising a purified polypeptide expressed from a mammalian cell line and a delivery agent are formulated as large porous particles for aerosol administration.

[00195] Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the purified polypeptide or protein and delivery agents are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

[00196] The compositions can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

[00197] In one embodiment, the compositions are prepared with carriers that will protect the polypeptide or protein against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

[00198] It is advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active polypeptide or protein calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

[00199] The polypeptide or protein expressed according to the present invention can be administered at various intervals and over different periods of time as required, e.g., one time per week for between about 1 to 10 weeks, between 2 to 8 weeks, between about 3 to 7 weeks, about 4, 5, or 6 weeks, etc. The skilled artisan will appreciate that certain factors can influence the dosage and timing required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Generally, treatment of a subject with a polypeptide or protein as described herein can include a single treatment or, in many cases, can include a series of treatments. It is furthermore understood that appropriate doses may depend upon the potency of the polypeptide or protein and may optionally be tailored to the particular recipient, for example, through administration of increasing doses until a preselected desired response is achieved. It is understood that the specific dose level for any particular animal subject may depend upon a variety of factors including the activity of the specific polypeptide or protein employed, the age, body weight, general health, gender, and diet of the subject, the time of administration, the route of administration, the rate of excretion, any drug combination, and the degree of expression or activity to be modulated.

[00200] The present invention includes the use of inventive compositions for treatment of nonhuman animals. Accordingly, doses and methods of administration may be selected in accordance with known principles of veterinary pharmacology and medicine. Guidance may be found, for example, in Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edition, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

[00201] Inventive pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

[00202] The foregoing description is to be understood as being representative only and is not intended to be limiting. Alternative methods and materials for implementing the invention and also additional applications will be apparent to one of skill in the art, and are intended to be included within the accompanying claims.

Examples

Example 1: Enhanced Medium 1 for anti-GDF-8 Fed-batch Process

[00203] Traditional fed-batch processes for cultivating cell lines have several drawbacks including the time and effort required to administer the feeds and the need for special equipment in large-scale bioreactors. The objective was to develop a batch media for the production of proteins of interest in large-scale bioreactors that requires minimal feeds.

Materials and Methods

[00204] STRAINS AND MEDIA: Chinese Hamster Ovary ("CHO") cells were engineered to express a monoclonal antibody against growth and differentiation factor 8 ("anti-GDF-8 cells") (see Veldman et al., Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor, US20040142382 A1). Anti-GDF-8 cells were used to test a new batch media. Medium 1 and Medium 2 were compared for their abilities to support high cell density and viability. The compositions of these media, as well as Medium 3 are listed in Table 1. Media are made by adding all the components save for $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. The media is then adjusted to pH 7.25, the osmolarity is recorded and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ are then added.

[00205] CULTURE CONDITIONS: For flask experiments, anti-GDF-8 cells were grown in shake flasks and passaged three times. For bioreactor experiments, anti-GDF-8 cells were grown in media for 12 days, supplemented daily with either 2% by volume of 20X Medium 4 feed medium (Table 3) or 3% by volume of 16X Medium 4 (Table 4) after day 5. For the first 4 days, cells were grown at 37°C. On day 5, cells were shifted to 31°C.

[00206] SAMPLE ANALYSIS: Daily samples were taken from the cultures and were analyzed for amino acid, vitamin, iron, phosphate, glucose and glutamine levels.

Table 1. Compositions of Medium 1, Medium 2 and Medium 3.

	Medium 1		Medium 2		Medium 3	
Amino Acids	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanine	89.03	1.00	17.80	0.20	24.67	0.28
arginine	1156.99	6.62	347.97	2.00	423.43	2.43
asparagine-H_2O	713.89	4.76	75.00	0.50	173.90	1.16
aspartic acid	318.83	2.39	26.20	0.20	52.72	0.40
cysteine-HCl-H_2O	70.01	0.40	70.19	0.40	70.01	0.40
cystine-2HCl	297.09	0.95	62.25	0.20	62.09	0.20
glutamic acid	169.88	1.00	29.40	0.20	41.08	0.28
glutamine	1662.40	12.98	1163.68	7.97	1162.40	7.98
glycine	98.88	1.25	30.00	0.40	35.92	0.48
histidine-HCl-H_2O	359.10	1.76	46.00	0.22	75.27	0.36
isoleucine	623.63	4.79	104.99	0.80	151.90	1.16
leucine	662.31	5.61	104.99	0.80	172.59	1.32
lysine-HCl	946.98	5.20	146.99	0.80	218.36	1.20
methionine	291.62	1.96	29.80	0.20	53.86	0.36
phenylalanine	428.62	2.60	65.99	0.40	99.81	0.60
proline	372.29	3.24	68.99	0.60	96.40	0.84
serine	904.71	8.62	126.00	1.20	278.07	2.60
threonine	613.36	4.31	94.99	0.80	132.81	1.12
tryptophan	158.32	0.76	16.00	0.08	28.99	0.14
tyrosine-2Na-2H_2O	660.61	2.15	103.79	0.40	145.10	0.56
valine	605.36	4.32	93.99	0.80	131.17	1.12
Vitamins	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
biotin	2.00	8.21	0.20	0.82	0.36	1.49
calcium pantothenate	22.02	46.27	2.24	4.71	4.03	8.47
choline chloride	87.87	630.74	8.96	64.60	16.11	115.62
folic acid	26.95	58.84	2.65	6.01	4.76	10.80
inositol	123.39	685.47	12.60	69.99	22.64	125.79
nicotinamide	19.60	160.70	2.02	16.56	3.61	29.62
pyridoxal-HCl	1.99	9.83	2.00	9.86	1.99	9.83
pyridoxine-HCl	16.09	67.87	0.03	0.15	1.67	8.10
riboflavin	2.20	5.85	0.22	0.59	0.40	1.06
thiamine-HCl	21.61	63.84	2.17	6.44	3.92	11.64
vitamin B12	6.93	5.12	0.76	0.56	1.34	0.99
Inorganic Salts	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
$CaCl_2$	118.78	1.04	116.09	1.05	118.78	1.04
KCl	310.94	4.17	311.77	4.18	310.94	4.17
NaH_2PO_4	70.81	0.50	70.99	0.50	70.81	0.50

NaCl	1104.86	18.92	6539.00	94.85	3704.86	63.44
NaH_2PO_4-H_2O	636.53	4.61	62.49	0.45	114.33	0.83
$MgSO_4$	48.70	0.41	48.83	0.41	48.70	0.41
$MgSO_4$-$7H_2O$	0.03	98.00			8.80	98.00
$MgCl_2$	28.83	0.30	28.81	0.30	28.83	0.30
$NaHCO_3$	2000.00	23.81	2440.00	29.04	2440.00	29.04
Trace Elements	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
Sodium Selenite	28.00	161.94	5.00	28.92	7.00	40.48
$Fe(NO_3)_3$-$9H_2O$	49.86	123.42	50.00	123.76	49.86	123.42
$CuSO_4$	2.99	18.80	0.80	5.00	0.87	5.08
$CuSO_4$-$5H_2O$	11.24	45.00			7.48	30.00
$FeSO_4$-$7H_2O$	2503.88	9008.84	838.86	3021.48	1542.56	5549.81
$ZnSO_4$-$7H_2O$	2734.77	9520.82	429.98	1498.12	1383.80	4821.89
$MnSO_4$-H_2O	0.28	1.81			0.17	1.01
Na_2SiO_3-$9H_2O$	210.00	738.27			140.00	492.84
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$-$4H_2O$	1.86	1.50			1.24	1.00
NH_4VO_3	0.96	8.55			0.66	5.66
$NiSO_4$-$6H_2O$	0.20	0.74			0.13	0.49
$SnCl_2$-$2H_2O$	0.18	0.80			0.12	0.53
Other Components	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
Hydrocortisone	0.23	0.64	0.04	0.10	0.08	0.24
Putrescine-2HCl	6.48	40.22	1.08	6.70	2.48	15.39
linoleic acid	0.22	0.80	0.04	0.14	0.08	0.29
thioctic acid	0.86	2.73	0.10	0.49	0.14	0.69
D-glucose (Dextrose)	18038.48	89107.32	6150.72	34170.84	11042.24	61348.78
PVA	2550.00		2400.00		2550.00	
Insulin	54.00		10.00		14.00	
Sodium Pyruvate	54.85	498.83	55.00	499.86	54.85	498.83

Results and Conclusions

[00207] Figure 1 shows that growth rate of anti-GDF-8 cells was similar in both Medium 1 and Medium 2 in the flask experiments.

[00208] Figure 2 shows that in bioreactors, Medium 1 exhibited a significant increase in final cell density and viability over Medium 3. The final titer also increased significantly, from 551 mg/L for the platform process to 976 mg/L with Medium 1(data not shown). Temperature was shifted from 37°C to 31°C on day 5. Due to the unexpected high cell growth, the cultures were fed daily after day 5 with either 2% by volume of 20X Medium 4 or 3% by volume of 16X Medium 4. Thus,

this is not a true batch experiment as originally intended. Asparagine and thiamine were supplemented in the feed media beginning on day 10.

[00209] In developing a concentrated batch media, several possible concerns need to be considered. First, concentrated nutrients might prove toxic to the cells. In the media developed in this Example, all nutrients and components were determined to be below the toxicity limits (data not shown).

[00210] Second, the concentrated batch media necessarily has a higher osmolarity than non-concentrated media, which has been shown to have detrimental effects on cell growth and viability. This problem can be circumvented by lowering the amount of NaCl in the starting media. Furthermore, the concentrated batch media contains insufficient levels of glucose to sustain growth for the entire culture period. Thus, cultures were supplemented daily after day 5 with a glucose feed.

[00211] Third, insulin and glutamine are susceptible to degradation during the 12 day culture period. Thus, the culture was supplemented with these components in addition to glucose.

[00212] Finally, iron will precipitate out of solution containing high concentrations of phosphate at high pH. This problem can be circumvented by adding iron at the end of the media preparation process, after the pH has been adjusted to an appropriate level.

Example 2: Development of concentrated feed medium (Medium 5) for anti-GDF-8 cells in fed-batch process.

[00213] In Example 1, a batch process for culturing anti-GDF-8 cells using Medium 1 was developed. Due to the high cell density that resulted during the process, it was determined that supplementation of nutrients in addition to glucose and glutamine was still advantageous. However, supplementing the batch with 8X Medium 4 feed media would result in excessive dilution of the culture. A more concentrated feed media was developed in order to circumvent this problem.

Materials and Methods and Results

[00214] Table 2 lists the compositions of Medium 4A-1, Medium 4B, Trace B and Trace D used in the formulations of Tables 3-7.

Table 2. Compositions of Medium 4A-1, Medium 4B, Trace B and Trace D used in the formulations of Tables 3-7.

	Medium 4A-1		Medium 4B		Trace Elements B		Trace Elements D	
Amino Acids	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanine	17.80	0.20						
arginine	191.00	1.10						
asparagine-H_2O	135.00	0.90						
aspartic acid			66.50	0.50				
glutamic acid			29.40	0.20				
glycine	15.00	0.20						
histidine-HCl-H_2O	73.50	0.35						
isoleucine	116.00	0.90						
leucine	170.00	1.30						
lysine-HCl	182.00	1.00						
methionine	59.60	0.40						
phenylalanine	82.50	0.50						
proline	69.00	0.60						
serine	105.00	1.00						
threonine	95.20	0.80						
tryptophan	32.60	0.16						
tyrosine-2Na-2-H_2O			104.00	0.40				
valine	93.60	0.80						
Vitamins	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	mM	mg/L	mM
biotin	0.41	1.68						
calcium pantothenate	4.80	9.45						
choline chloride	17.90	128.78						
folic acid			6.30	12.02				
inositol	25.20	140.00						
nicotinamide	4.00	32.79						
pyridoxine-HCl	4.10	19.90						
riboflavin	0.46	1.20						
thiamine-HCl	4.40	13.06						
vitamin B12	1.40	1.03						
Trace Elements	µg/L	nM	mg/L	µM	µg/L	nM	µg/L	nM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$-4-H_2O					1.24	1.00		
$CuSO_4$	0.43	2.69						
$CuSO_4$-5-H_2O							7.48	30.00
$FeSO_4$-7-H_2O							834	3000
$MnSO_4$-H_2O					0.17	1.01		
Na_2SO_4-5-H_2O					140.00	492.84		

NH_4VO_3					0.85	5.00		
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$					0.13	0.49		
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$					0.12	0.53		
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	220.00	801.39					863	3007
Other Components	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
linoleic acid			42.00	0.15				
thioctic acid			105.00	0.51				
D-glucose (Dextrose)			1000000	5555.56				

20X Medium 4.

[00215] The first concentrated media was developed as 20X Medium 4. The media formulation for 20X Medium 4 is provided in Table 3.

Table 3. 20X Medium 4 feed media worksheet.

Part	Component	Amount	Unit
I	Medium 4A-1	31.120	g/L
	Nucellin™	40.000	ml/L
	H/P stock	20.000	ml/L
	Selenite Stock	2.000	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2.610	g/L
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.430	g/L
	Aspartic acid	1.330	g/L
	Glutamic acid	0.588	g/L
	Linoleic acid	0.840	ml/L
	Thioctic acid	2.100	ml/L
	Tyrosine·2Na (Mw 225)	1.790	g/L
	1000X Trace B	6.000	ml/L
	Glucose	100.000	g/L
	Glutamine	14.600	g/L
	pH to 7.0		
	Record Osmolarity	1064.000	mOsm
II	Cysteine (400 mM)	Add 108 ml Trace D, 0.25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ to 280 ml Cysteine Stock	
III	Folic acid	720 ml 6 mM Folic acid	

Note: Nucellin™ is manufactured by Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine·2HCl.

[00216] The media formulation consists of 3 parts: I, II, III. Part I is the concentrated version of 8X Medium 4 with the individual components of Medium 4B except folic acid due to the concerns of the solubility of this vitamin. Part II is iron stock, Trace D and acidic cysteine, to avoid possible precipitation of iron if added in part I. Part III is folic acid stock. Part I is added 2% by volume daily starting on day 5 and parts II and III are added once on day 5 together with Part I.

[00217] The final pH of the feed media was adjusted to 7.0 and osmolarity was about 1064 mOsm. A 2% feed will result in a 2g/L glucose, a 2 mM Glutamine and a 14 mOsm osmolarity increase to the culture.

2. 16X Medium 4.

[00218] To reduce the increase in osmolarity, the feed media was changed from 20X Medium 4 (2% by volume daily) to 16X Medium 4 (3% by volume daily). The media formulation for 16X Medium 4 is provided in Table 4.

Table 4. 16X Medium 4 feed media worksheet.

Part	Component	Amount	Unit
I	Medium 4A-1	24.896	g/L
	Nucellin™	32.000	ml/L
	H/P stock	16.000	ml/L
	Selenite Stock	1.600	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2.088	g/L
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.344	g/L
	Aspartic acid	1.064	g/L
	Glutamic acid	0.470	g/L
	Linoleic acid	0.672	ml/L
	Thioctic acid	1.680	ml/L
	Tyrosine·2Na (Mw 225)	1.432	g/L
	1000X Trace B	9.000	ml/L
	Glutamine	6.280	g/L
	pH to 7.0		
	Record Osmolarity	295.000	mOsm
II	Cysteine (400 mM)	Add 108 ml Trace D, 0.25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ to 280 ml Cysteine Stock	
III	Folic acid	720 ml 6 mM Folic acid	

Notes: Nucellin™ is manufactured by Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine·2HCl.

[00219] In this modified 16X Medium 4, glucose was also eliminated to further reduce the osmolarity and give some flexibility of the glucose feed. Total osmolarity of the feed media is now 295 mOsm.

3. 16X Medium 4.

[00220] Changes were made to the 16X Medium 4 formulation. Iron stock solution was added in the feed resulting in a 0.45 μM addition each feed. Additionally, glucose was added back to give a 1.5 g/L addition every feed. The media formulation for this modified 16X Medium 4 is provided in Table 5.

Table 5. 16X Medium 4 feed media worksheet.

Part	Component	Amount	Unit
I	Medium 4A-1	24.896	g/L
	Nucellin™	32.000	ml/L
	H/P stock	16.000	ml/L
	Selenite Stock	1.600	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2.088	g/L
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.344	g/L
	Aspartic acid	1.064	g/L
	Glutamic acid	0.470	g/L
	Linoleic acid	0.672	ml/L
	Thioctic acid	1.680	ml/L
	Tyrosine·2Na (Mw 225)	1.432	g/L
	1000X Trace B	9.000	ml/L
	Glucose	50.000	g/L
	Glutamine	7.300	g/L
	pH to 7.0		
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 mM stock)	15.000	ml/L
	Record Osmolarity	607.000	mOsm
II	Folic acid	720 ml 6 mM Folic acid	
III	Cysteine (400 mM)	Add 108 ml Trace D, 0.25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ to 280 ml Cysteine Stock	

Note: Nucellin™ is manufactured by Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine·2HCl.

4. 16X Medium 4.

[00221] Here, the feed media (16X Medium 4) was made in combined media instead of 3 separate feeds as in the last several batches. Tests were done to ensure that folic acid could be dissolved at the concentration required and that neither iron nor folic acid precipitated out of solution after storage at either 4°C or at room temperature for 6 days. The media formulation for the combined 16X Medium 4 is provided in Table 6.

Table 6. 16X Medium 4 feed media worksheet.

Component	Amount	Unit
Medium 4A-1	24.896	g/L
Nucellin™	32.000	ml/L
H/P stock	16.000	ml/L
Selenite Stock	1.600	ml/L
PVA	2.400	g/L
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2.088	g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.344	g/L
Aspartic acid	1.064	g/L
Glutamic acid	0.470	g/L
Linoleic acid	0.672	ml/L
Thioctic acid	1.680	ml/L
Tyrosine-2Na (Mw 225)	1.432	g/L
Glucose	66.700	g/L
Glutamine	7.300	g/L
Folic acid	70.560	mg/L
Acidic cysteine (400 mM)	6.250	ml/L
$FeSO_4$ Stock (1 mM)	23.000	ml/L
1000x Trace B	9.000	ml/L
1000x Trace D	3.300	ml/L
pH expected 6.11	Adjust to 7.0	
Record Osmolarity	724.000	mOsm

Note: Nucellin™ is manufactured by Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine-2HCl.

[00222] The final osmolarity of the media is 724 mOsm, with a daily glucose addition of 2g/L and glutamine addition of 1.5 mM.

5. 12X Medium 4.

[00223] Here, several changes were made to the feed media. Medium 4B powder was used instead of addition of each individual ingredient in Medium 4B. Medium

4B powder was mixed with glucose and dissolved separately under basic conditions by titrating the solution to pH 10.25. Additional asparagine and thiamine were added since the amino acid and vitamin analysis results showed these two components were exhausted by the end of fed-batch process. Use of 12X Medium 4 further reduced the osmolarity increase when fed to the culture. The media formulation for 12X Medium 4 is provided in Table 7.

Table 7. 12X Medium 4 feed media worksheet.

Component	Amount	Unit
Medium 4A-1	18.672	g/L
Nucellin™	24.000	ml/L
H/P stock	12.000	ml/L
Selenite Stock	1.200	ml/L
PVA	2.400	g/L
Asparagine.H2O	1.620	g/L
NaH2PO4.H2O	1.566	g/L
MgSO4.7H2O	0.258	g/L
Glutamine	5.475	g/L
Thiamine	0.040	g/L
Predissolved Medium 4B & Glucose	~175	ml/L
Acidic cysteine(400 mM)	4.688	ml/L
Record pH		
Adjust pH to 7.2 with 5N HCl		
$FeSO_4$ Stock (1 mM)	17.250	ml/L
1000x Trace B	6.750	ml/L
1000x Trace D	2.475	ml/L
Record pH (expect 7.18)		
Record Osm	566.000	
Predissolved Medium 4B & Glucose * (for 1L feed media)		
Water	150 ml	
Mix Medium 4B (14.5g) with glucose (38.3 g)	Add in	
Adjust pH using 25% NaOH until dissolved (pH about 10.25)		

Note: Nucellin™ is manufactured by Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine-2HCl.

[00224] The final osmolarity is 566 mOsm. A daily feed of 4% by volume gives an approximate osmolarity increase of 8.6, an increase in glucose of 2g/L and an increase in glutamine of 1.5 mM. The 12X Medium 4 media formulation is also known as Medium 5. Medium 5 is easy to make compared to 20X Medium 4 or 16X Medium 4, and stable over 10 days either at room temperature or at 4°C (data not shown).

Example 3: Glutamine Starvation Fed-batch Process for anti-GDF-8 Cell Culture

[00225] CHO cells require glutamine in the starting media to survive. Traditionally, initial glutamine levels are high and glutamine is fed daily after day 5 until the end of the fed-batch process. Traditional fed-batch processes normally result in high lactate and ammonium levels in the cell cultures, which are known to have inhibitory effects on cell growth, cell density and recombinant protein expression. Fed-batch processes in which glucose is slowly added to the culture have been shown to lower lactate production and improve cell growth, cell density and recombinant protein expression. However, prior art methods for manipulation of glucose addition are not practical for large-scale manufacturing. Here, by utilizing culture media with lower starting levels of glutamine and eliminating glutamine from the feed, it is shown that lower levels of ammonium and lactate are produced, leading to increased cell viability. Additionally, in glutamine-starved cultures, recombinant protein expression is increased and final osmolarity is reduced.

Materials and Methods

[00226] STRAINS AND MEDIA: anti-GDF-8 cells were cultured in a fed-batch mode in Medium 1 in 1 L Bioreactor.

[00227] CULTURE CONDITIONS: Cells were grown for twelve days in 1L Bioreactors. Temperature was shifted from 37°C to 31°C on either day 4 or day 5 depending on the cell growth. Three fed-batch processes were tested: a normal (control) process, a no glutamine feed process and a glutamine starvation process. Pertinent details of these processes are listed in Table 8 and Table 9.

Table 8. Fed-batch process in 1L Bioreactors with no glutamine feed process.

	Control process	No glutamine feed process
Starting media Glutamine (mM)	13 mM	13 mM
Glutamine feed	5 mM on Day 4	No feed of glutamine
Feed media	Medium 5 (with 37.5 mM glutamine)	Medium 5 without glutamine
Feed schedule	4% daily from Day 5	4% daily from Day 5
Temperature shift to 31°C	Day 4	Day 5

Table 9. Fed-batch process in 1 L Bioreactors with glutamine starvation process

	Control process	Low glutamine process
Starting media Glutamine (mM)	13 mM	4 mM
Glutamine feed	5 mM on Day 4	No feed of glutamine
Feed media	Medium 5 (with 37.5 mM glutamine)	Medium 5 without glutamine
Feed schedule	4% daily from Day 5	4% daily from Day 5
Temperature shift to 31°C	Day 4	Day 5

[00228] SAMPLE ANALYSIS: Daily samples were taken from the cultures and were analyzed for cell density, cell viability, lactate, glutamine, and ammonium levels. Titer of expressed anti-GDF-8 antibody was also measured daily.

Results and Conclusions

[00229] Figure 3 shows the cell density of cultures grown in either no glutamine feed or control fed-batch conditions. In both cases, cell density was similar over the course of the experiment.

[00230] Figure 4 shows percent cell viability in cultures grown in either no glutamine feed or control fed-batch conditions. The no glutamine feed culture showed a markedly higher cell viability toward the end of the experiment, beginning on day 6.

[00231] Figure 5 shows ammonium levels in cultures grown in either no glutamine feed or control fed-batch conditions. The no glutamine feed culture showed a marked decrease in ammonium levels toward the end of the experiment, beginning on day 4.

[00232] Figure 6 shows lactate levels in cultures grown in either no glutamine feed or control fed-batch conditions. Lactate levels were slightly lower in the no glutamine feed culture throughout the course of the experiment.

[00233] Figure 7 shows anti-GDF-8 antibody titer in cultures grown in either no glutamine feed or control fed-batch conditions. Final anti-GDF-8 antibody titer was higher in the no glutamine feed culture.

[00234] Figure 8 shows the cell density of cultures grown in either glutamine-starved or control fed-batch conditions. In both cases, cell density was similar over the course of the experiment.

[00235] Figure 9 shows cell viability in cultures grown in either glutamine-starved or control fed-batch conditions. In both cases, cell viability was similar over the course of the experiment.

[00236] Figure 10 shows ammonium levels in cultures grown in either glutamine-starved or control fed-batch conditions. The glutamine-starved culture showed a marked decrease in ammonium levels throughout the course of the experiment.

[00237] Figure 11 shows lactate levels in cultures grown in either glutamine-starved or control fed-batch conditions. The glutamine-starved culture showed a marked decrease in lactate levels throughout towards the end of the experiment, beginning on day 4.

[00238] Figure 12 shows anti-GDF-8 antibody titer in cultures grown in either glutamine-starved or control fed-batch conditions. Final anti-GDF-8 antibody titer was higher in the glutamine-starved culture.

[00239] Collectively these results indicate that decreased glutamine levels are beneficial to cell cultures by reducing the amount of ammonium production, increasing cell viability and increasing titer of expressed anti-GDF-8 antibody. In addition, in the glutamine-starved cultures, low lactate levels were observed, possibly due to the decreased glucose consumption rate. Decreased ammonium and lactate levels also have the effect of reducing total osmolarity. Elevated osmolarity is also known to have inhibitory effects on cell growth and viability. Low initial glutamine levels together with the elimination of the glutamine feed also has the positive effect of reducing ammonium produced as a result of non-enzymatic glutamine degradation in stored media. Elimination of glutamine in the feed also simplifies the process of culturing anti-GDF-8 cells.

Example 4. Iron dose response of anti-GDF-8 cells in Medium 1 and Medium 2.

[00240] Medium 1 is much more concentrated in nutrients than Medium 2. The optimum iron levels for cell growth in Medium 1 were determined in order to avoid problems with iron deficiency during cell culture.

Materials and Methods

[00241] Anti-GDF-8 cells were cultured in dishes for one passage in either Medium 1 or Medium 2. Iron concentrations of these media were manipulated by addition of different amounts of stock iron solution. Final cell densities were measured by CEDEX.

Results and Conclusions

[00242] Figure 13 shows the Fe dose response of anti-GDF-8 cells in Medium 1 and Medium 2 containing different iron concentrations. In Medium 2, the cell density was relatively constant for iron concentrations ranging from 3 μM to 15 μM. In Medium 1, cell density increases with increasing iron concentration but reaches a maximum after approximately 5 μM. This difference could be due to the high nutrient content in Medium 1, which might reduce iron availability to the cells as a consequence of chelation of iron in the media. These results indicate that iron levels should be kept above 5 μM to avoid problems with iron deficiency in Medium 1.

Example 5. Substitution of Glutamate for Glutamine in the Bioreactor Process.

[00243] Three experiments were performed to test the effects of substituting glutamate for glutamine in an anti-Lewis Y cell culture process.

Materials and Methods

[00244] The experiments were performed in 10L bioreactors at pH 7.1, 30% dissolved oxygen, and a starting temperature of 37°C with a shift to 31°C on day 5. Sparge and headspace gasses were 88% of a 93% air/7% CO_2 mix and 12% oxygen. The starting media in all experiments was Medium 1, which contains glutamine. Feed media and feed schedule including supplemental glucose and glutamine feeds are shown in Table 10. Columns labeled "Glutamate" were fed with modified

Medium 5, containing no glutamine, but containing a molar concentration of glutamate equal to the molar glutamine concentration in standard Medium 5. Columns labeled glutamine were fed with standard Medium 5.

Table 10. Feed schedule.

Day	9040-44		9040-56		9040-64	
	Glutamate 1	Glutamine 1	Glutamate 2	Glutamine 2	Glutamate 3	Glutamine 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM gln		5 mM gln	3 g/L gluc3	7.7 mM gln 2.9g/l gluc
5	3.6 g/ gluc	5 mM gln 5.5 g/L gluc	3.5 g/L gluc	5 mM gln 6 g/L gluc	3 g/L gluc	3 g/L gluc
6	12% 16XMedium 4	12% 16XMedium 4	17% Medium 5	17% 16XMedium 4	29% Medium 5	29% Medium 5
7		4 mM gln				
8						
9		2.5 g/L gluc				
10	10% 16XMedium 4	10% 16XMedium 4	8% Medium 5	5% 16XMedium 4		
11		1 g/L gluc				
12						
13		1 g/L gluc				

Results and Conclusions

[00245] Within each experiment, cell density is similar as shown in Figure 14. Cell densities are low in the Glutamine 2 and Glutamate 2 experiments due to a pH deviation to about 6.7 on day 3 on the process. The drop in density between day 6 and 7 in the Glutamine 3 and Glutamate 3 experiments is due to the 29% media feed on day 6.

[00246] Figure 15 shows cell viability of the glutamate and glutamine fed cultures. Viabilities remained higher during the second half of the process in the bioreactors containing glutamate fed cultures.

[00247] In Experiment 1, anti-Lewis Y titer is similar between the glutamate and glutamine fed cultures. Figure 16 shows that in Experiments 2 and 3, anti-Lewis Y titers are lower in the glutamine fed reactors. The lower anti-Lewis Y titer observed

in these reactors could be due to the high levels of lactate produced, as shown in Figure 17.

[00248] Bioreactors run with glutamate in the feed media have a lower ammonium concentration (Figure 18) and a lower osmolarity (Figure 19).

[00249] The binding ELISA assay was used to test activity of samples from the Glutamine 1 and Glutamate 1 experiments. The activities were similar: 110% of reference for the Glutamine 1 sample and 122% of reference for the Glutamate 1 sample (data not shown).

[00250] The substitution of glutamate for glutamine in these experiments does not have a significant effect on cell density. However, cell viability is lower in the Bioreactors fed with glutamine. Ammonium, lactate and osmolarity are lower in the Bioreactors fed with glutamate compared to those fed with glutamine. On average, anti-Lewis Y titer is higher in the Bioreactors fed with glutamate and activity is essentially the same under both conditions.

Example 6. Substitution of Glucose and Glutamine in the Anti-Lewis Y Cell Culture Process.

[00251] The purpose of this experiment was to test the effects of substitution of glucose and glutamine with the feed media listed in Table 11 below in the culturing of anti-Lewis Y cells (see Bogheart et al., Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts, Clin. Can. Res. 10:4538-49 (2004)). Cell density, cell viability, anti-Lewis Y titer and ammonium levels were measured.

Materials and Methods

[00252] The experiment was performed in 250 ml shake flasks at a starting volume of 75 ml. All shake flasks were seeded at 0.25 x 10^6 cells/ml in Medium 2. The flasks were incubated at 37°C in a 7% CO_2 incubator for 14 days. On days 3 and 4, the flasks were fed with 5% by volume of Medium 6 feed medium. The composition of Medium 6 is listed in Table 11. On days 5-13 the flasks were fed with 5% by volume of one of the feed solutions listed in Table 12. Each condition

was performed in duplicate. Samples were taken daily for cell counts by CEDEX and assays for ammonium, glucose, and lactate

Table 11. Composition of Medium 6.

Amino Acids	mg/L	mM	Trace Elements	µg/L	nM
alanine	142.48	1.60	Sodium Selenite	40.00	231.36
arginine	1628.84	8.79	$CuSO_4$	3.44	21.51
asparagine·H_2O	1060.80	7.20	$CuSO_4$·$5H_2O$	7.49	30.00
aspartic acid	532.40	4.00	$FeSO_4$·$7H_2O$	2534	9116
cystine·2HCl	473.00	1.51	$ZnSO_4$·$7H_2O$	2704	9421
glutamic acid	235.38	1.60	$MnSO_4$·H_2O	0.17	1.01
glutamine	4520.00	33.01	Na_2SiO_3·$9H_2O$	140	492.84
glycine	120.07	1.60	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$·$4H_2O$	1.24	1.00
histidine·HCl·H_2O	588.32	2.80	NH_4VO_3	0.65	5.56
isoleucine	944.82	7.21	$NiSO_4$·$6H_2O$	0.13	0.49
leucine	1360.75	10.39	$SnCl_2$·$2H_2O$	0.12	0.53
lysine·HCl	1456.80	8.00	$AlCl_3$·$6H_2O$	1.20	4.97
methionine	477.06	3.20	$AgNO_3$	0.17	1.00
phenylalanine	660.36	4.00	$Ba(C_2H_3O_2)_2$	2.55	9.98
proline	552.31	4.80	KBr	0.12	1.01
serine	1264.70	12.04	$CdCl_2$·$2.5H_2O$	2.28	9.99
threonine	762.02	6.40	$CoCl_2$·$6H_2O$	2.38	10.00
tryptophan	260.94	1.28	$CrCl_3$	0.32	2.02
tyrosine·2Na·$2H_2O$	832.62	3.19	NaF	4.20	100.02
valine	749.21	6.40	GeO_2	0.53	5.07
			KI	0.17	1.02
Vitamins	mg/L	mM	RbCl	1.21	10.01
biotin	3.28	0.01	$ZrOCl_2$·$8H_2O$	3.22	9.99
calcium pantothenate	36.02	0.08			
choline chloride	143.28	1.03	Other Components	µg/L	nM
folic acid	42.43	0.10	Hydrocortisone	286	0.79
inositol	201.71	1.12	Putrescine·2HCl	8000	49.66
nicotinamide	32.02	0.26	linoleic acid	336.25	1.20
pyridoxine·HCl	32.82	0.16	thioctic acid	840.63	4.08
riboflavin	3.60	0.01			
thiamine·HCl	35.22	0.10	Other Components	mg/L	mM
vitamin B12	11.21	0.01	D-glucose (Dextrose)	33005.69	183.37
			PVA	2400.00	
Inorganic Salts	mg/L	mM	Nucellin™	80.00	
KH_2PO_4	1635.00	12.02			
$MgSO_4$·$7H_2O$	171.96	0.70			

Table 12. Feeds on days 5-13. Modified Medium 6 contains no glucose or glutamine.

GluGln	Modified Medium 6 + 43 g/L glucose + 4.82 g/L glutamine (control)
Glu	Modified Medium 6 + 43 g/L glucose + 4.82 g/L glutamate
GluAsp	Modified Medium 6 + 43 g/L glucose + 4.36 g/L asparagine
GluGlyGln	Modified Medium 6 + 43 g/L glucose + 6.71 g/L glycylglutamine
GluGlu	Modified Medium 6 + 43 g/L galactose + 4.82 g/L glutamine
GalGlu	Modified Medium 6 + 43 g/L galactose + 4.82 g/L glutamate
GalGln	Modified Medium 6 + 43 g/L galactose + 4.36 g/L asparagine
GalGlyGln	Modified Medium 6 + 43 g/L galactose + 6.71 g/L glycylglutamine
GalAsp	Medium 6 + 43 g/L glucose

Results and Conclusions

[00253] The highest cell density was seen when glutamate or glycylglutamine was substituted for glutamine in the presence of either glucose or galactose in the feed media. Cell density was generally lower in the cultures fed with glucose/glutamine, galactose/glutamine, or glucose only (Figure 20). Final viability was highest in the cultures fed with glucose only, followed by the cultures fed with glucose/glutamate. The lowest viability was seen in the cultures fed with glutamine or asparagine combined with either glucose or galactose (Figure 21).

[00254] Day 14 titer was highest in the glucose/glycylglutamine and the glucose/glutamate fed cultures at about 700 μg/ml. Titer was lowest in the galactose/glycylglutamine and the galactose/asparagine fed cultures at about 500 μg/ml. Titer in the glucose/glutamine control was about 570 μg/ml (Figure 22).

[00255] The lowest ammonium levels were seen in the flasks fed with glucose/glutamate or glucose only. The flasks fed with galactose/glutamate, glucose/glutamine, glucose/glycylglutamine, and glucose/asparagine showed intermediate levels of ammonium. The flasks fed with galactose/asparagine, galactose/glycylglutamine, and galactose/glutamine had the highest levels of ammonium (Figure 23).

[00256] Glucose levels remained above 1 g/L in all flasks fed with galactose until day 11. From day 11 through day 14, the glucose in these cultures was never completely depleted, remaining between 0.6 and 1 g/L, with no significant differences between the different cultures.

[00257] Glucose levels increased in all flasks fed with glucose or glucose combined with another substrate until day 10. From day 10 through day 14 in these

cultures, glucose levels remained fairly constant and similar to each other. On day 14 about 8.4 g/L glucose remained in the glucose/glutamate fed cultures and about 10.8g/L glucose remained in the cultures fed with glucose only.

[00258] Lactate levels reached a high of about 2.4 g/L on day 5, when conditions were the same for all cells, and dropped to essentially zero in all cultures by day 14. Lactate levels were highest from day 10 through day 14 in the glucose/glutamine control, but were below 1 g/L during this time (data not shown).

[00259] All conditions tested in this experiment resulted in higher cell density than the control glucose/glutamine condition. All conditions tested except the galactose/asparagine condition resulted in higher final viability than either the glucose/glutamine control or the galactose/glutamine fed condition. Titer in the glucose/glutamine control was about 570 µg/ml compared to a high of about 700 µg/ml in the glucose/glycylglutamine fed condition and the glucose/glutamate fed condition.

Example 7. Evaluation of a Glutamine Starved Batch Process for the Production of anti-GDF-8.

[00260] Typical fed-batch production methods require multiple feeds over the culture period. These feeds are designed to replace nutrients in the medium that may have been depleted by the cells or may have degraded during the batch. These feeds create complications when the process is scaled up to be used in larger reactors, such as the need for an impeller jump (see Figure 24). Furthermore, the feeds dilute the amount of anti-GDF-8 already secreted into the culture and therefore affect the harvest titer. The use of a batch process would allow inoculation of the bioreactor at full volume, instead of at a partial volume so as to accommodate the feeds, which would remove the necessity of an impeller jump and greatly reduce any dilution effect on productivity.

[00261] Glutamine is one of the most important reasons that a fed-batch approach is used since it is not stable at 37°C and it had been thought that it needed to be replenished during a batch culture. However, results of Examples 2, 5, and 6, in which a glutamine starvation strategy was tested, showed a significant increase in productivity compared to a control reactor that was fed glutamine. This result was combined with the batch process to create a glutamine starvation batch process that was tested in this Example.

Materials and Methods

[00262] Anti-GDF-8 cells were grown in IL Bioreactors for 12 days according to the following four growth conditions. Bioreactor parameters for all conditions were kept the same. Dissolved oxygen was maintained at no lower than 23% of air saturation by sparging with air and pH was maintained at 7.00 by the addition of a solution containing sodium bicarbonate at 0.58 M and sodium carbonate at 0.71 M. The temperature of all cultures was maintained at 37°C for the first four days of the batch. On the fourth day of the batch the temperature of all the bioreactors was lowered to 31°C and maintained at this point for the duration of the batch. The control and fed-batch cultures were fed with 8%, 12%, and 8% total reactor volume of their respective feed media on days 5, 7, and 10, respectively.

[00263] 1) Control.

- Inoculation medium Medium 7 (see Table 13).
- Feed Medium 8, fed on days 5, 7, and 10 (see Table 13).
- Feed 5 mM of glutamine on day 4.
- Lower the temperature to 31°C on day 4.

[00264] 2) Fed-batch glutamine starvation.

- Inoculation medium Medium 7 with only 4 mM of glutamine (see Table 13).
- Feed Medium 8 without glutamine, fed on days 5, 7, and 10 (see Table 13).
- No glutamine feed on day 4.
- Lower the temperature to 31°C on day 4.

[00265] 3) Batch glutamine starvation.

- Inoculation medium new batch medium with only 4 mM of glutamine (see Table 13).
- No feed medium.
- No glutamine feed.
- Lower the temperature to 31°C on day 4.
- Add 5g/L of glucose on day 8.

[00266] 4) Batch glutamine starvation supplemented on day 8.

- Inoculation medium new batch medium with only 4 mM of glutamine (see Table 13).
- No feed medium.
- No glutamine feed.
- Lower the temperature to 31°C on day 4.
- Add 4g of glucose, 375 mg of Asparagine, 3 mL of 1 mM $FeSO_4$ stock, 3.33 mL of 5 g/L Nucellin™ stock, 2.57 mL of 36 mg/L Hydrocortisone and 1.0 g/L Putrescine stock solution, 0.23 mL of 50 mg/L Sodium Selenite stock, and 13.1 mg of Thiamine on day 8.

Table 13. Compositions of media used.

	MW	Medium 7	Medium 8	Batch media
Amino acids		mM	mM	mM
L-Alanine	89.0	1.08	2.4	0.2
L-Arginine	174.0	6.84	13.2	4
L-Asparagine-H_2O	150.0	4.76	21.4	7.5
L-Aspartic acid	133.0	2.40	6	1.65
L-Cysteine-HCl-H_2O	176.0	0.40	0	0.4
L-Cystine-2HCl	313	0.96	1.575	1
L-Glutamic acid	147.0	1.08	2.4	1.08
L-Glutamine	146.0	13.00	37.5	4
Glycine	75.0	1.28	2.4	1.54
L-Histidine-HCl-H_2O	210.0	1.76	4.2	1.76
L-Isoleucine	131.0	4.76	10.8	2.83
L-leucine	131.0	6.52	15.6	4.7
Lysine-HCl	182.0	5.20	12	5.2
L-Methionine	149.0	1.96	4.8	2.8
L-Phenylalanine	165.0	2.60	6	2.2
L-proline	115.0	3.24	7.2	4.1
L-serine	105.0	8.60	18	8.6
L-threonine	119.0	4.32	9.6	3.2
L-tryptophan	204.0	0.78	1.92	1.04
L-tyrosine 2Na-2H_2O	291.0	2.16	4.8	1.75
L-valine	117.0	4.32	9.6	4
Vitamins		uM	uM	uM

Biotin	244.0	8.31	20.4	11
D-Calcium pantothenate	476.0	46.06	112.8	46.06
choline chloride	139.0	632.2	1548	840
folic acid	441.0	58.8	144	58.8
I-inositol	180.0	666	1650	911
nicotinamide	122.0	161.7	396	215
pyridoxine-HCl	206.0	66.15	240	66
pyridoxal-HCl	203.0	10	0	10
riboflavin	376.0	5.37	13.2	1.1
thiamine-HCl	337.0	63.7	274.7	117
vitamin B12	1355.0	4.9	12	7.8
Inorganic salts				
NaCl	58.5	18.8 mM		
KCl	74.6	4.2 mM		4.19 mM
$CaCl_2$	111	1.05 mM		1.05 mM
Sodium Selenite	173	27 ug/L	60 ug/L	60 ug/L
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	142	4.68 mM	11 mM	4.68 mM
Na_2HPO_4	138	0.5 mM		0.3986 mM
$MgSO_4$	120	1.15 mM	1.05 mM	1.15 mM
$MgCl_2$	95	0.3 mM		0.3 mM
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	278	9 uM	24.875 uM	9 uM
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	404	0.125 uM		0.124 um
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287	9.2 uM	17 uM	9.2 um
$CuSO_4$	160	0.05 uM	0.074 uM	0.064 um
$NaHCO_3$	84	23.8 mM		23.8 mM
Others				
Glucose	180	16 g/L	36.3 g/L	15 g/L
Polyvinyl alcohol		2.56 g/L	2.4g/L	2.56 g/L
Hydrocortisone	363	0.23 mg/L	0.43 mg/L	0.28 mg/L
Putrescine-2HCl	161	6.4 mg/L	12 mg/L	7.7 mg/L
Sodium pyruvate	110	500 uM		500 uM
linoleic acid	280	0.61 uM	1.5 uM	0.61 uM
thioctic acid	206	2.7 uM	6 uM	2.7 uM
Nucellin™		64 mg/L	120 mg/L	50 mg/L
1000x Trace B		1.5 ml/L	6.75 ml/L	1.5 ml/L

Results and Conclusions

[00267] Cell growth for the first 4 days was similar for the control and batch processes, while the glutamine starved fed-batch process had a slightly lower cell density and remained a little lower for the rest of the batch. Both batch processes

maintained higher cell densities for the duration of the batch, probably due to the lack of any significant dilution (see Figure 25). Viabilities of all the cultures were the same up to day 8. However, it is interesting to note that on day 11, the viability of the batch process that was not supplemented was lower than the other three bioreactors and ended up significantly lower by the final day. This suggests that the batch medium could still be optimized since the supplemented batch process had a viability that was the same as the fed-batch bioreactors (see Figure 26).

[00268] Cells cultured in either glutamine starved batch process or in the glutamine starved fed-batch process outperformed the same cells cultured in the control fed-batch process in productivity. The control fed-batch process had a harvest day titer of 685 μg/mL, as expected, while the glutamine starved fed-batch process had a harvest titer of 1080 μg/mL, about 58% higher than the control. This is similar to results seen previously. The glutamine starved non-supplemented batch process had a harvest day titer of 960 μg/mL, 40% higher than the control, similar to the glutamine starved fed-batch process, while the supplemented glutamine starved batch process had the highest titer at 1296 μg/mL. This is an 89% increase over the control (see Figure 27).

[00269] When the inhibitor levels for the four conditions were analyzed the results showed that the lactate and ammonia levels for all three glutamine starved processes were significantly lower than the control. In fact, after day 4, those three conditions either stopped producing or started consuming lactate while the control continued to produce lactate throughout the batch (see Figure 28). As expected, the ammonia levels were much lower in the glutamine starved processes and declined after day 4, while the control continued to produce ammonia (see Figure 29).

[00270] In this Example, combining a batch process with a glutamine starvation strategy resulted in a 40% improvement in productivity over the control fed-batch process for anti-GDF-8 cells. The data also suggest that with some optimization of the batch medium, an almost 2-fold improvement in productivity can be attained. This improvement in productivity can be attributed to two factors. First, glutamine starvation increases productivity either directly or by keeping ammonia and lactate levels very low. Second, because of the absence of feeds, the titer is not diluted during the batch. Increased productivity together with the ease of operation inherent in a batch process makes this an attractive option for producing recombinant polypeptides.

Example 8. Effects of Glutamine and Asparagine concentrations in batch media on anti-GDF-8 cell culture process.

[00271] In Examples 2, 5 and 6, it was demonstrated that glutamine starvation conferred benefits on fed-batch cultures in two cell lines, including increased cell growth, cell viability and titer as well as decreased production of lactate and ammonium. Asparagine also seems to play a role in batch media.

Materials and Methods

[00272] Anti-GDF-8 cells were cultured for twelve days in 1L Bioreactors in modified Medium 9 with differing concentrations of glutamine and asparagine. Base Medium 9 composition is listed in Table 14. Experimental variations on this base composition are listed in Table 15. The cultures were incubated at 37°C for the first 5 days with the exception of Reactor 4, whose temperature was 30°C for the first day due to temperature control problems. The cultures were shifted to 31°C on day 6. On day 7, the cultures were fed once with 5% by volume Medium 5 lacking glutamine. Cultures were measured daily for cell density, anti-GDF-8 titer, lactate and ammonium levels.

Table 14. Composition of Medium 9.

Amino Acids	mg/L	mM	Trace Elements	µg/L	nM
alanine	17.80	0.20	Sodium Selenite	69.16	400.00
arginine	696.00	4.00	$Fe(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	50.00	123.76
asparagine-H_2O	3000.00	20.00	$CuSO_4$	10.24	64.00
aspartic acid	219.48	1.65	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	99.88	400.00
cysteine-HCl-H_2O	70.40	0.40	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4170	15000
cysteine-2HCl	466.75	1.50	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2640	9200
monosodium glutamate	33.80	0.20	$MnSO_4 \cdot H_2O$	33.80	200.00
glutamine	584.00	4.00	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	284.07	1000
glycine	116.60	1.64	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	247.20	200.00
histidine-HCl-H_2O	474.60	2.28	NH_4VO_3	2.34	20.00
isoleucine	570.73	4.36	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	5.26	20.00
leucine	1030.70	7.87	$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	0.90	4.00
lysine-HCl	1401.40	7.70	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0.97	4.00
methionine	387.40	2.60	KBr	0.48	4.00
phenylalanine	507.00	3.07	$CrCl_3$	15.83	100.00
proline	539.50	4.69	NaF	0.17	4.00
serine	1052.00	10.02	GeO_2	0.42	4.00

threonine	584.80	4.75	KI	33.20	200.00
tryptophan	274.16	1.34	RbCl	0.48	4.00
tyrosine·2Na·2H$_2$O	748.75	2.66	H_3BO_3	12.37	200.00
valine	749.00	6.40	LiCl	0.17	4.00
Vitamins	mg/L	mM	Other Components	µg/L	nM
biotin	2.68	0.01	Hydrocortisone	540.00	1.49
calcium pantothenate	21.92	0.05	Putrescine·2HCl	16000	93.11
choline chloride	158.46	1.14	linoleic acid	290.00	1.04
folic acid	25.93	0.06	thioctic acid	716.00	3.48
inositol	183.96	0.91			
nicotinamide	26.23	0.22	Other Components	mg/L	mM
pyridoxal·HCl	2.03	0.01	D-glucose (Dextrose)	15000.00	83.33
pyridoxine·HCl	36.13	0.18	PVA	2550.00	
riboflavin	2.41	0.01	Nucellin™	50.00	
thiamine·HCl	39.43	0.12	Sodium Pyruvate	55.00	0.50
vitamin B12	21.17	0.02			
Inorganic Salts	mg/L	mM			
$CaCl_2$	116.65	1.05			
KCl	312.90	4.19			
Na_2HPO_4	56.80	0.40			
NaCl	1100.00	18.80			
$NaH_2PO_4·H_2O$	645.84	4.68			
$MgSO_4$	138.00	1.15			
$MgCl_2$	28.50	0.30			
$NaHCO_3$	2000.00	23.81			

Table 15. Glutamine and Asparagine conditions tested.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Cell line	anti-GDF-8					
Media	Batch media (Medium 9)					
Glutamine levels	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Asparagine levels	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
Seeding density (x10^6/ml)	0.3 to 0.35					
Feed media	Medium 5-Glutamine, 5% on Day 7					
Culture Days	12					
Temperature shift (37-31°C)	Day 6	Day 6	Day 6	Day 5	Day 5	Day 4

Results and Conclusions

[00273] Figures 30, 31, 32 and 33 show the cell growth of anti-GDF-8 cells, anti-GDF-8 titer, lactate levels and ammonium levels, respectively, throughout the course of the experiments under the various experimental conditions.

[00274] Under all experimental conditions, 4 mM glutamine is better than 1 mM glutamine at all the Asparagine levels tested. At comparable glutamine levels, 12 mM and 20 mM asparagine conditions are better than 8 mM asparagine conditions. Decreased lactate and NH_4 levels were observed at the end of the culture for all conditions tested.

Example 9. Effects of Glutamine and Asparagine concentrations in batch media on anti-GDF-8 cell culture process.

[00275] In Example 8, it was demonstrated that Medium 9 containing an initial concentration of 4 mM glutamine performs better than media containing 1 mM glutamine, regardless of asparagine levels. This example demonstrates the effect of media containing 13 mM glutamine levels and various asparagine levels.

Materials and Methods

[00276] Anti-GDF-8 cells were cultured for twelve days in 1L Bioreactors in modified Medium 9 with differing concentrations of glutamine and asparagine as listed in Table 16. The cultures were incubated at 37°C for the first 3 days. The cultures were then shifted to 31°C on day 4. On day 7, the cultures were fed once with 5% by volume Medium 5 lacking glutamine. Cultures were measured periodically for cell density, cell viability, lactate, ammonium levels and glutamine levels, anti-GDF-8 titer, and osmolarity.

Table 16. Glutamine and Asparagine conditions tested.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Cell line	anti-GDF-8					
Media	Batch media (Medium 9)					
Glutamine levels	4 mM	4 mM	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
Asparagine levels	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8 mM
Seeding density ($x10^6$/ml)	0.3 to 0.35					
Feed media	Medium 6 lacking glutamine, 5% on Day 7					

Culture Days	12					
Temperature shift (37-31°C)	Day 4	Day 4	Day 4	Day 4	Day 4	Day 4

Results and Conclusions

[00277] Figures 34, 35, 36, 37, 38, 39 and 40 show the cell growth of anti-GDF-8 cells, percent viability of anti-GDF-8 cells, lactate levels, ammonium levels, glutamine levels, anti-GDF-8 titer, and osmolarity, respectively, throughout the course of the experiments under the various experimental conditions.

[00278] Among all the conditions tested, only Medium 9 containing 13 mM glutamine and 20 mM asparagine showed significant adverse effects on cell growth and titer. Glutamine is exhausted in all the cultures at approximately the same time, regardless of whether the culture begins with 4 mM or 13 mM glutamine. The highest anti-GDF-8 titer is obtained in cultures that contain 13 mM glutamine and 12 mM asparagine. All culture conditions exhibit decreased lactate and ammonium levels near the end of the culture. Ammonium levels were highest in the culture containing 13 mM glutamine and 20 mM asparagine.

Example 10. The effect of asparagine and cystine levels on the observed decrease in lactate and ammonium levels in anti-GDF-8 cells cultured in Medium 9.

[00279] In Examples 2, 5 and 6, it was found that cultures grown under glutamine starvation conditions exhibit decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process. However, cultures grown in Medium 9 under non-glutamine starvation conditions still exhibit decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process. This effect was not observed in other media such as Medium 1, where glutamine starvation appears necessary for the decreased levels of lactate and ammonium. Medium 9 and Medium 1 differ in the levels of asparagine (20 mM in Medium 9 versus 11 mM total in Medium 1 plus feed) and acidic cystine (1.5 mM in Medium 9 versus 0.95 mM in Medium 1). This example tests whether these two components were responsible for the observed decrease in the lactate and ammonium levels at the end of the culture.

Materials and Methods

[00280] Anti-GDF-8 cells were cultured in 1L BioReactors for 12 days. Cells were initially cultured at 37°C and were shifted to 31°C on day 4 or day 5 at 8-10x10^6/ml. Table 17 lists the various experimental conditions tested. Samples were taken daily and saved for titer analysis by Protein A HPLC.

Table 17. Asparagine and cysteine conditions tested.

Media	Gln (mM)	Asn (mM)	Total Gln (mM)	Total Asn (mM)	Feed	
Medium 1	13	5	29	11	Medium 5, 30% total	5 mM Gln, day 4
Medium 1	4	5	4	11	Medium 5-Gln, 30% total	
Batch media (Medium 9)	4	20	4	21	Medium 5-Gln, 5% day 7	
Medium 1+ 5 mM Asn + 0.5 mM Cystine	13	10	29	16	Medium 5, 30% total	5 mM Gln, day 4
Batch media (Medium 9)	13	20	29	21	Medium 5, 30% total	5 mM Gln, day 4

Note: Medium 5-Gln = Medium 5 lacking glutamine.

Results and Conclusions

[00281] Anti-GDF-8 cells grown in Medium 9 exhibited decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process, regardless of whether the cultures were started with 4 mM or 13 mM glutamine (see Figures 42 and 43). In contrast, Medium 1 only exhibited decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process when the cultures were started with 4 mM glutamine (see Figures 42 and 43). Addition of extra asparagine and cystine to Medium 1 containing 13 mM glutamine did not result in decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process (see Figures 42 and 43).

[00282] Cultures that exhibited decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process (Medium 1 with 4 mM glutamine, Medium 9 with 4 mM glutamine and Medium 9 with 13 mM glutamine) were also observed to have lower total osmolarity at the end of the culture process (see Figure 47).

[00283] Medium 9 with 4 mM glutamine exhibited the highest anti-GDF-8 titer, followed by Medium 9 with 13 mM glutamine fed on day 4 (see Figure 46). Taking the effect of dilution of the feed into account, Medium 9 containing 4 mM

glutamine had equivalent anti-GDF-8 titer to Medium 9 containing 13 mM glutamine.

Example 11. The effect of amino acid and vitamin levels on the observed decrease in lactate and ammonium levels in anti-GDF-8 cells cultured in Medium 9.

[00284] Example 10 tested whether difference in the asparagine and cysteine levels between Medium 1 and Medium 9 were responsible for the observed decrease in lactate and ammonium levels at the end of the culture process in Medium 9 that was not starved for glutamine. It was determined that these factors were not responsible for the observed decrease. Medium 1 and Medium 9 also differ in their amino acid and vitamin concentrations. This example tests whether differences in amino acids and vitamin concentrations between these two media are responsible for the observed decrease.

Materials and Methods

[00285] Anti-GDF-8 cells were cultured in 1L BioReactors for 12 days. Cells were initially cultured at 37°C and were shifted to 31°C on day 4 at 8-10x10^6/ml. Table 18 lists the various experimental conditions tested. Amino acids, vitamins, hydrocortisone and putrescine, trace elements E (composition listed in Table 19) and iron were added to the various experimental Medium 1 conditions such that the levels of these components were equal to the levels in Medium 9. Samples were taken daily and saved for titer analysis by Protein A HPLC.

Table 18. Amino acid and vitamin conditions tested.

Media	Gln (mM)	Asn (mM)	Feed	Day 5	Day 7	Day 10	Day 11
Medium 1	13	8	Medium 8 30% total 6 mM Gln, day 4	5% Medium 5	12% Medium 5	8% Medium 5	
Medium 1+AA	13	18	Medium 8 30% total 6 mM Gln, day 4	5% Medium 5	12% Medium 5	8% Medium 5	
Medium 1+VB,H/P,E,Fe	13	8	Medium 8 30% total 6 mM Gln, day 4	5% Medium 5	12% Medium 5	8% Medium 5	4g/L glucose
Medium 1+all	13	18	Medium 8 30% total 6 mM Gln, day 4	5% Medium 5	12% Medium 5	8% Medium 5	4g/L glucose
Medium 9 with 13 mM Gln	13	20	Medium 8 30% total 6 mM Gln, day 4	5% Medium 5	12% Medium 5	8% Medium 5	

Note: AA = Amino acids, H/P: = 0.036 mg/mL hydrocortisone, 1.08 mg/mL Putrescine•2HCl, E: Trace Elements E.

Table 19: Composition of Trace Elements E.

Trace Elements	µg/L	nM
$(NH_4)6Mo_7O_{24}•4H_2O$	123.60	100.00
$AlCl_3•6H_2O$	0.48	2.00
H_3BO_3	6.18	100.00
$CrCl_3$	7.92	50.00
$CuSO_4•5H_2O$	49.94	200.00
GeO_2	0.21	2.00
KBr	0.24	2.00
KI	16.60	100.00
LiCl	0.08	2.00
$MnSO_4•H_2O$	16.90	100.00
$Na_2SiO_3•9H_2O$	142.03	500.00
NaF	0.08	2.00
NH_4VO_3	1.17	10.00
$NiSO_4•6H_2O$	2.63	10.00
RbCl	0.24	2.00
$SnCl_4•2H_2O$	0.45	2.00
Sodium Selenite	34.58	200.00

Results and Conclusions

[00286] All conditions tested exhibited decreased lactate and ammonium levels at the end of the culture process except for Medium 1 containing added amino acids, indicating that increased amino acid levels in Medium 9 compared to Medium 1 are probably not responsible for the decreases in lactate and ammonium levels (see Figures 49 and 50). However, Medium 1 containing added vitamins, hydrocortisone and putrescine, trace elements E and iron exhibited lower lactate and ammonium levels at the end of the culture process compared to Medium 1 containing added amino acids (see Figures 49 and 50). This indicates that these components may be responsible for the observed decreases in Medium 9.

[00287] Cultures grown in Medium 1 containing added vitamins, hydrocortisone and putrescine, trace elements E and iron exhibited the lowest levels of ammonium throughout the experiment due to the lower total amounts of asparagine and glutamine in the starting media (see Figure 50).

Example 12. The effect of vitamin, trace elements E and iron levels on the observed decrease in lactate and ammonium levels in anti-GDF-8 cells cultured in Medium 9.

[00288] In Example 11, it was determined that the increased levels of vitamins, hydrocortisone and putrescine, trace elements E and iron in Medium 9 relative to Medium 1 might be responsible for the decrease in lactate and ammonium levels observed at the end of the culture process. Here, these components were tested individually and in combination to determine which, if any, were responsible for the observed decrease.

Materials and Methods

[00289] Anti-GDF-8 cells were cultured in 1L BioReactors for 12 days. Cells were initially cultured at 37°C and were shifted to 31°C on day 4 at 8-10x10^6 cells/ml, with the exception of Medium 1 containing trace E elements, which were shifted on day 4 at about 6x10^6 cells/ml. Table 20 lists the various experimental conditions tested. Hydrocortisone and putrescine were added to all Medium 1 conditions such that the levels of these components were equal to the levels in Medium 9. Vitamins, Trace elements E (composition listed in Table 19) and iron were added to the various experimental Medium 1 conditions such that the levels of these components were equal to the levels in Medium 9. Samples were taken daily and saved for titer analysis by Protein A HPLC.

Table 20. Amino acid and vitamin conditions tested.

Media	Gln (mM)	Asn (mM)	Feed	Temp Shift	Day 4	Day 5	Day 7	Day 10
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+Fe	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+E	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+Vit	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+Fe+E	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+Fe+Vit	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
Medium 1+E+Vit	13	15	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium
Medium 9 with 13			Medium 5 30%			5% Medium	12%	
mM Gln	13	20	total	day 4	5 mM Gln, day 4	5	Medium 5	5% Medium

Note: E: Trace Elements E.

Results and Conclusions

[00290] Of all the conditions tested, only Medium 9 containing 13 mM glutamine and Medium 1 containing trace elements E exhibited decreased levels of lactate and ammonium at the end of the culture process (see Figures 54 and 55). It should be noted that the decreased levels observed for Medium 1 containing trace elements E could be due to the fact that this culture was temperature shifted when the cells were at about $6x10^6$ cells/mL.

[00291] Medium 9 containing 13 mM glutamine exhibited higher anti-GDF-8 titer than any of the Medium 1 formulations.

Example 13. Comparison of Mediums 1, 3 and 9 on cell growth and anti-GDF-8 titer.

[00292] This experiment was performed to measure the differences in cell growth and anti-GDF-8 titer using Mediums 1, 3 and 9.

Materials and Methods

[00293] Anti-GDF-8 cells were cultured in various media and under feeding conditions as listed in Table 21. Pertinent media information is listed in Table 22. Cells were grown in 1L Bioreactors for 12 days and were shifted from 37°C to 31°C on day 4.

Table 21. Media and feed conditions tested.

			Feed						
Media	Asn	Gln	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 10	Day 11
Medium 3	14 mM	4 mM	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	10% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln
Medium 3	14 mM	4 mM	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	10% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln	3.3% Medium 5-Gln
Medium 1	14 mM	4 mM			8% Medium 5-Gln		12% Medium 5-Gln	8% Medium 5-Gln	
Medium 9	20 mM	4 mM				8% Medium 5-Gln			

Note: Medium 5-Gln – Medium 5 lacking glutamine.

Table 22. Media summary.

Media	Asn	Gln	Feed	AA(Starting)/(Total)	Ion/Total AA
Medium 3	14 mM	4 mM	34% Medium 5-Gln	34 mM / 84 mM	1.75
Medium 9	20 mM	4 mM	6% Medium 5-Gln	91.4 mM / 94.3 mM	.72
Medium 1	14 mM	4 mM	31.6% Medium 5-Gln	78 mM / 99.4 mM	.74

Note: Medium 5-Gln – Medium 5 lacking glutamine.

Results and Conclusions

[00294] Anti-GDF-8 cells cultured in Medium 9 exhibited the highest cell density and anti-GDF-8 titer, while anti-GDF-8 cells cultured in Medium 3 exhibited the lowest cell density and anti-GDF-8 titer (see Figures 57 and 58). The fact that Medium 9 produces superior results than Medium 1 indicates that it is better to provide the media components in the starting media rather than supplying them through multiple feeds. Additionally, the fact that both Medium 1 and Medium 9 perform better than Medium 3 indicates that providing amino acids in concentrations greater than about 70 mM provide superior results than providing amino acids in concentrations less than about 70 mM. Finally, providing amino acids in concentrations greater than about 70 mM in the starting media results in the highest cell densities and titers (compare Medium 9 vs. Medium 1).

Example 14. Statistical analysis of optimum total glutamine and asparagine levels in Medium 9 for anti-GDF-8 cell culture in Bioreactors.

Materials and Methods

[00295] Anti-GDF-8 cells were grown in 1L Bioreactors and were shifted from 37°C to 31°C on the days indicated in Table 23. Final titers were subjected to a T-test in order to determine the optimum level of glutamine alone and the optimum level of total combined glutamine and asparagine. Table 23 summarizes some relevant experimental conditions and end results for anti-GDF-8 cells grown in Medium 9.

Table 23. Relevant experimental conditions and end results for anti-GDF-8 cells grown in Medium 9.

Media	Gln (mM)	Asn (mM)	Day Shifted	Feed	Titer (ug/ml)	Titer/1200	Total Gln	Total Asn	Total
Medium 9	1	8	6	6% Medium 5-Gln	616.2	0.51	1	9	
Medium 9	1	8	8	6% Medium 5-Gln	857.1	0.71	4	9	
Medium 9	1	12	8	6% Medium 5-Gln	947	0.79	1	13	
Medium 9	4	12	4	6% Medium 5-Gln	1184	0.99	4	13	

Medium 9	4	20	4	5% Medium 5-Gln	769.6	0.84	1	21	
Medium 9	4	8	6	5% Medium 5-Gln	1282.8	1.08	13	9	
Medium 9	4	20	4	5% Medium 5-Gln	1158	1.00	4	21	
Medium 9	4	20	4	5% Medium 5-Gln	1321.1	1.10	4	21	
Medium 9	4	20	4	5% Medium 5-Gln	1182.4	0.97	4	21	
Medium 9	13	20	4	5% Medium 5-Gln	1456.8	1.20	4	21	
Medium 9	13	12	4	5% Medium 5-Gln	1838.8	1.37	13	13	
Medium 9	13	12	4	5% Medium 5-Gln	1808.7	1.34	13	13	
Medium 9	13	20	4	5% Medium 5-Gln	1076.91	0.90	13	21	
Medium 9	13	20	4	5% Medium 5-Gln	1088.4	0.88	13	21	
Medium 9	13	20	4	5% Medium 5-Gln	1076.91	0.90	16	21	
Medium 9	13	8	4	Asn, Gln, 5% Medium 5-Gln	974.82	0.81	28.5	11	
Medium 9	13	20	4	Asn, Gln, 5% Medium 5-Gln	831.91	0.69	28.5	28	
Medium 9	13	20	4	Medium 5, 30% total, 5 mM Gln day 4	978.4	0.81	28.5	28	
Medium 9	13	20	4	Medium 5, 30% total, 5 mM Gln day 4	973.5	0.81	28.5	28	

Note: Medium 5-Gln – Medium 5 lacking glutamine.

Results and Conclusions

[00296] Figure 59 shows extrapolated anti-GDF-8 titers for various levels of glutamine alone and total combined glutamine and asparagine. Table 24 shows the results of a T-test comparing normalized titer of glutamine levels between 2 and 15 mM and glutamine levels outside this range. Table 25 shows the results of a T-test comparing normalized titer of combined glutamine and asparagine levels between 16 and 36 mM and combined glutamine and asparagine levels outside this range.

[00297] Both T-test results indicated significant differences in anti-GDF-8 titers between the two groups that were compared. Cultures grown in Medium 9 containing between 2 and 15 mM glutamine and between 16 and 36 mM combined glutamine and asparagine exhibited higher anti-GDF-8 titers than cultures grown in media with glutamine and combined glutamine and asparagine levels that fell outside these ranges. In all experiments, asparagine levels were greater than 9 mM.

Table 24. T-Test results comparing normalized titer of 2 mM<Gln<15 mM versus Gln>15 mM, Gln<2 mM conditions.

Normalized Titer	Gln>15, Gln <2	2<Gln<15
Mean	0.724648817	1.033147493
Variance	0.013328865	0.036834109
Observations	7	12
Pooled Variance	0.028837361	

Hypothesized Mean Difference	0	
df	17	
t Stat	-3.839791986	
P(T<=t) one-tail	0.000856219	
t Critical one-tail	1.739606432	
P(T<=t) two-tail	0.001312436	
t Critical two-tail	2.109818524	

Table 25. T-Test results comparing normalized titer of 16 mM<Gln+Asn<36 mM versus Gln+Asn>36 mM, Gln+Asn<16 mM conditions.

Normalized Titer	Asn+Gln>36, Asn+Gln<16	16<Asn+Gln<36
Mean	0.735066564	1.027071104
Variance	0.012061148	0.041504987
Observations	7	12
Pooled Variance	0.031113044	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	17	
t Stat	-3.480818523	
P(T<=t) one-tail	0.001430281	
t Critical one-tail	1.739606432	
P(T<=t) two-tail	0.002860561	
t Critical two-tail	2.109818524	

Example 15. Effects of Medium on Cell Culture.

[00298] This example investigated the performance of three cell culture medium variations at intermediate scale utilizing high density seed cultures. All of the media tested were expected to show improvements over the Phase 1 medium (Medium 10 fed with Medium 11 feed medium), based on small scale bioreactor data.

Materials and Methods

[00299] CHO cells expressing a humanized anti-Abeta peptide IgG1 monoclonal antibody ("anti-ABeta cells") were tested in various media, as shown in Table 26 (see Basi et al., Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide, WO02/46237). The pH low end set point was 7.0 controlled with 0.95M Na_2CO_3 + 0.05M K_2CO_3, except for Phase 1, which was controlled with a solution containing sodium bicarbonate at 0.58 M and sodium carbonate at 0.71 M. Dissolved oxygen was controlled at 30% by sparging on demand with air, agitation was at 60 rpm, and the feed medium was Medium 5 (with or without glutamine, as noted). All cultures

were grown at 130L scale except for 03P49B501, which was grown at 500L scale. In brief, Medium 1 is enriched in all nutrients, without consideration for relative uptake rates, while Medium 12 was balanced by removing apparently unnecessary nutrients from the indiscriminately enriched version. The compositions of Mediums 10, 11 and 12 are listed in Table 27.

Table 26. Initial medium, feed quantities and seed sources for Pilot runs.

Batch No.	Description	Initial Medium	Amount Fed	Gln fed?	Seed Source	Seed Density (Viables/mL)
1	Phase 1	Medium 10	38% *	Yes	Wave bags	0.2×10^6
2	Rich Medium, High Gln (1)	Medium 1	16%	Yes	Wave bags	0.2×10^6
3	Rich Med, High Gln (2)	Medium 1	16%	Yes	Wave bags	0.2×10^6
4	Rich Med, Lower Gln	Medium 1	16%	No	Wave bags	0.2×10^6
5	Balanced Med, Low Gln (1)	Medium 12	10%	No	Wave bags	0.2×10^6
6	Bal Med, Low Gln (2)	Medium 12	6%	No	Wave bags	0.2×10^6
7	Bal Med, Low Gln, Dense Seed	Medium 12	6%	No	High density Bioreactor	2.0×10^6

* The Phase 1 process was fed with Medium 12, which is not as rich as Medium 5.

Table 27. Compositions of Mediums 10, 11 and 12.

	Medium 10		Medium 11		Medium 12	
Amino Acids	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanine	24.87	0.28	142.48	1.60	17.80	0.20
arginine	423.43	2.43	1528.84	8.79	696.00	4.00
asparagine-H_2O	173.90	1.16	1080.60	7.20	1500.00	10.00
aspartic acid	52.72	0.40	532.40	4.00	219.45	1.65
cysteine-HCl-H_2O	70.01	0.40			70.40	0.40
cysteine-2HCl	62.09	0.20	470.00	1.50	312.50	1.00
glutamic acid	41.08	0.28	235.38	1.60		
monosodium glutamate					33.60	0.20
glutamine	1162.40	7.96	6000.00	41.10	584.00	4.00
glycine	35.92	0.48	120.07	1.60	115.50	1.54

histidine·HCl·H_2O	75.27	0.36	556.32	2.60	369.60	1.76
isoleucine	151.90	1.16	944.62	7.21	370.73	2.83
leucine	172.69	1.32	1360.75	10.39	615.70	4.70
lysine·HCl	218.38	1.20	1456.80	8.00	946.40	5.20
methionine	53.55	0.36	477.06	3.20	367.40	2.60
phenylalanine	98.81	0.60	660.36	4.00	363.00	2.20
proline	96.40	0.84	552.31	4.80	471.50	4.10
serine	273.07	2.60	1284.70	12.04	903.00	8.60
threonine	132.81	1.12	782.02	6.40	380.80	3.20
tryptophan	28.99	0.14	280.94	1.28	212.16	1.04
tyrosine·2Na·2H_2O	146.10	0.68	832.62	3.19	486.75	1.75
valine	131.17	1.12	749.21	6.40	468.00	4.00
Vitamins	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
biotin	0.36	1.48	3.28	13.45	2.68	11.00
calcium pantothenate	4.03	8.47	36.02	75.67	21.93	46.06
choline chloride	18.11	115.92	143.28	1030	116.76	840.00
folic acid	4.76	10.80	42.43	96.22	25.93	58.80
inositol	22.84	125.79	201.71	1120	163.96	911.00
nicotinamide	3.81	29.82	32.02	262.44	28.23	215.00
pyridoxal·HCl	1.99	9.83			2.03	10.00
pyridoxine·HCl	1.67	8.10	32.82	159.31	18.13	88.00
riboflavin	0.40	1.06	3.60	9.58	0.41	1.10
thiamine·HCl	3.92	11.64	35.22	104.51	39.43	117.00
vitamin B12	1.34	0.99	11.21	8.27	10.57	7.80
Inorganic Salts	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
$CaCl_2$	118.78	1.04	113.27	1.02	116.55	1.05
KCl	310.94	4.17			312.90	4.19
KH_2PO_4			1640.00	12.06		
Na_2HPO_4	70.81	0.50			56.80	0.40
NaCl	3704.96	63.44				
$NaH_2PO_4·H_2O$	114.53	0.83			645.84	4.68
$MgSO_4$	48.70	0.41			138.00	1.15
$MgSO_4·7H_2O$	8.60	0.03	170.00	0.69		
$MgCl_2$	28.53	0.30			28.50	0.30
$NaHCO_3$	1220.00	14.52			2000.00	23.81
Trace Elements	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
Sodium Selenite	7.00	40.49	40.00	231.35	53.65	310.27
$Fe(NO_3)_3·9H_2O$	49.66	123.42			50.00	123.76
$CuSO_4$	0.97	6.06	3.44	21.51	10.00	62.50
$CuSO_4·5H_2O$	7.49	30.00	7.49	30.00	49.94	200.00

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1542	5549	2534	9115	3366	12000
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1383	4821	2704	9421	2640	9198
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.17	1.01	0.17	1.01	16.90	100.00
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	140	492.84	140.00	492.84	142.03	500.00
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1.24	1.00	1.24	1.00	123.60	100.00
NH_4VO_3	0.65	5.56	0.65	5.56	1.17	10.00
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	0.13	0.49	0.13	0.49	2.63	10.00
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	0.12	0.53	0.12	0.53	0.45	2.00
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$			1.20	4.97	0.48	2.00
$AgNO_3$			0.17	1.00		
$Ba(C_2H_3O_2)_2$			2.55	9.98		
KBr			.12	1.01	0.24	2.00
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$			2.28	9.99		
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$			2.38	10.00		
$CrCl_3$			0.32	2.02	7.92	50.00
NaF			4.20	100.02	0.08	2.00
GeO_2			0.53	5.07	0.21	2.00
KI			0.17	1.02	16.60	100
RbCl			1.21	10.01	0.24	2.00
$ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$			3.22	9.99		
H_3BO_3					6.18	100.00
LiCl					0.08	2.00
Other Components	µg/L	µM	µg/L	µM	µg/L	µM
Hydrocortisone	86.40	.24	288.00	0.79	360.00	0.99
Putrescine-2HCl	2480	15.39	8000	49.66	10000	62.07
linoleic acid	56.69	0.20	336.25	1.20	290.00	1.04
thioctic acid	141.71	0.69	840.63	4.08	716.00	3.48
Other Components	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
D-glucose (Dextrose)	11042.24	61.35	43005.99	238.92	15000.00	83.33
PVA	2820.00		2400.00		2580.00	
Nucellin™	14.00		80.00		50.00	
Sodium Pyruvate	54.95	0.50			55.00	0.50

Results and Conclusions

[00300] Media changes led to steady improvement through the course of these experiments. In terms of cell growth, viability, reduced lactate levels, reduced ammonium levels, and titer, reduced glutamine levels were better than elevated ones (see Figures 60-64) and balanced (batch) medium was better than rich medium

(Medium 1, see Figures 60-64). Cultures started from high density inoculum exhibited higher final titer than did cultures started from lower density inoculums (see Figure 64).

[00301] Unlike what was observed in small scale bioreactors, the first medium (Medium 1 with high Gln) resulted in lower titers than did the original process (see Figure 64). There also was no shift to lactate uptake after the temperature change (see Figure 62). This suggests that there may be some scale sensitivity with this medium. This conclusion is supported by small-scale (2L) parallel runs that were done along with these intermediate scale experiments (data not shown). The later medium formulations containing less glutamine were not sensitive to scale, at least in these experiments (see Figures 60-65). The duplicated processes (Batches 2 and 3 and Batches 5 and 6) show very good run-to-run reproducibility (see Figures 60-65), increasing the confidence in all of the data gathered in this campaign.

Example 16. Production of TNFR-Ig using Medium 9.

Materials and Methods

[00302] CHO cells expressing a dimeric fusion protein consisting of the extracellular ligand-binding portion of the human 75 kilodalton (p75) tumor necrosis factor receptor (TNFR) linked to the Fc portion of IgG1 ("TNFR-Ig cells") were seeded at high density from a perfusion bioreactor and diluted to $3x10^6$ viable cells/ml in Medium 9 for the production bioreactor step.

Results and Conclusions

[00303] Figures 66, 67, 68, 69, 70, 71 and 72 show cell growth, cell viability, residual glucose, glutamine levels, lactate concentration, ammonium concentration, and relative product titer, respectively. Under the range of minor modifications to the process, all conditions yielded good cell growth, high cellular viability, and high overall final titer.

[00304] For all the conditions of this experiment, the metabolic inhibitory byproduct lactate was either consumed, or the concentration plateaued, suggesting that lactate production was arrested. Similarly, for the inhibitory metabolite ammonium, levels rose initially, but at some time after the temperature shift the ammonium started to be consumed by the cells. In this Example, the TNFR-Ig cell cultures were subjected to the chemical inducants sodium butyrate, and HMBA.

Example 17. Comparison of Large and Small-scale Culture Conditions

Materials and Methods

[00305] To determine whether the size of the culture affected relevant culture characteristics, anti-GDF-8 cells were grown in either small-scale 1 liter bioreactors or large-scale 6000 liter bioreactors. Cells were grown at 37°C and shifted to 31°C on day 4.

Results and Conclusions

[00306] As can be seen in Figures 73, 74, 75 and 76 (which show cell density, titer, lactate levels and ammonium levels, respectively), there were no relevant differences between the 6000 liter large-scale and 1 liter small-scale cultures for these characteristics. Both lactate and ammonium levels began to decrease after the temperature shift on day 4. This example demonstrates that the size of the culture does not affect cell density, cell viability, lactate levels and ammonium levels when the cultures are subjected to the same growth conditions.

Claims

What is claimed is:

1. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing glutamine and having a medium characteristic selected from the group consisting of: (i) a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, (v) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

2. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM; and

said medium containing glutamine; and

said medium having two medium characteristics selected from the group consisting of: (i) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iii) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, (iv) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

3. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2; and

said medium containing glutamine; and

said medium having two medium characteristics selected from the group consisting of: (i) a medium containing a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iii) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, (iv) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a

viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

4. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2; and

said medium containing glutamine; and

said medium having two medium characteristics selected from the group consisting of: (i) a medium containing a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, (iv) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

5. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1; and

said medium containing glutamine; and

said medium having two medium characteristics selected from the group consisting of: (i) a medium containing a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iv) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

6. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM; and

said medium containing glutamine; and

said medium having two medium characteristics selected from the group consisting of: (i) a medium containing a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and combinations thereof;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce to a viable cell density within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

7. The method of claim 1, wherein said cell culture condition in said changing at least one of the culture conditions step is selected from the group consisting of: (i) temperature, (ii) pH, (iii) osmolality, (iv) chemical inductant level, and combinations thereof.

8. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 13 mM.

9. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 10 mM.

10. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 7 mM.

11. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 4 mM.

12. The method of claim 1, wherein the total cumulative amount per unit volume of glutamine of said medium is less than or equal to 13 mM.

13. The method of claim 1, wherein the total cumulative amount per unit volume of glutamine of said medium is less than or equal to 10 mM.

14. The method of claim 1, wherein the total cumulative amount per unit volume of glutamine of said medium is less than or equal to 7 mM.

15. The method of claim 1, wherein the total cumulative amount per unit volume of glutamine of said medium is less than or equal to 4 mM.

16. The method of claim 1, wherein glutamine is only provided in the initial medium at the beginning of the cell culture.

17. The method of claim 1, wherein the concentration of soluble iron in the media is greater than 5 μM.

18. The method of claim 1, wherein viable cell density of said culture is measured on a periodic basis.

19. The method of claim 1, wherein viability of said culture is measured on a periodic basis.

20. The method of claim 1, wherein said lactate levels of said culture is measured on a periodic basis.

21. The method of claim 1, wherein said ammonium levels of said culture is measured on a periodic basis.

22. The method of claim 1, wherein said titer of said culture is measured on a periodic basis.

23. The method of claim 1, wherein osmolarity of said culture is measured on a periodic basis.

24. The method of claims 18-23, wherein said measurements are taken daily.

25. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $2x10^2$ cells/mL.

26. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $2x10^3$ cells/mL.

27. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $2x10^4$ cells/mL.

28. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $2x10^5$ cells/mL.

29. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $2x10^6$ cells/mL.

30. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $5x10^6$ cells/mL.

31. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least $10x10^6$ cells/mL.

32. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 1000 L of a culture.

33. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 2500 L of a culture.

34. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 5000 L of a culture.

35. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 8000 L of a culture.

36. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 10,000 L of a culture.

37. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 12,000 L of a culture.

38. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 30 to 42 degrees Celsius.

39. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 32 to 40 degrees Celsius.

40. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 34 to 38 degrees Celsius.

41. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 36 to 37 degrees Celsius.

42. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 37 degrees Celsius.

43. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 25 to 41 degrees Celsius.

44. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 27 to 38 degrees Celsius.

45. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 29 to 35 degrees Celsius.

46. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 29 to 33 degrees Celsius.

47. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 30 to 32 degrees Celsius.

48. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 31 degrees Celsius.

49. The method of claim 1, further comprising a second changing step subsequent to first said changing at least one of the culture conditions comprising changing at least one of the culture conditions, so that a third set of conditions is applied to the culture.

50. The method of claim 49, wherein the second changing step comprises changing at least one culture condition selected from the group consisting of: (i) temperature, (ii) pH, (iii) osmolality, (iv) chemical inducteant level, and combinations thereof.

51. The method of claim 49, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately 25 to 40 degrees Celsius.

52. The method of claim 49, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately 27 to 37 degrees Celsius.

53. The method of claim 49, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately 29 to 34 degrees Celsius.

54. The method of claim 49, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately 30 to 32 degrees Celsius.

55. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 0-8 days.

56. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 1-7 days.

57. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 2-6 days.

58. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 3-5 days.

59. The method of claim 1, wherein said first period of time is approximately 4 days.

60. The method of claim 1, wherein said first period of time is approximately 5 days.

61. The method of claim 1, wherein said first period of time is approximately 6 days.

62. The method of claim 1, wherein the total of said first period of time and said second period of time is at least 5 days.

63. The method of claim 1, wherein in the step of maintaining said culture for a second period of time, the lactate level decreases subsequent to the lactate level in the culture reaching a maximal level.

64. The method of claim 1, wherein in the step of maintaining said culture for a second period of time, the ammonium level decreases subsequent to the ammonium level in the culture reaching a maximal level.

65. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced polypeptide is at least 1.5-fold higher that the amount of polypeptide produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.

66. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced polypeptide is at least 2-fold higher that the amount of polypeptide produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.

67. The method of claim 1, wherein said cell culture is further provided with supplementary components.

68. The method of claim 67, wherein said supplementary components are provided at multiple intervals.

69. The method of claim 67 wherein said supplementary components are selected from a group consisting of hormones and/or other growth factors, particular ions (such as sodium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers, vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), amino acids, lipids, or glucose or other energy source.

70. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising steps of;

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a defined medium containing glutamine and having at least two medium characteristics selected from the group consisting of: i) a starting amino acid concentration greater than about 70 mM, ii) a molar glutamine to asparagine ratio of less than about 2, iii) a molar glutamine to total amino acid ratio of less than about 0.2, iv) a molar inorganic ion to total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and v) a combined glutamine and asparagine concentration greater than about 16 mM;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

71. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising steps of;

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a defined medium containing glutamine and having at least three medium characteristic selected from the group consisting of: i) a starting amino acid concentration greater than about 70 mM, ii) a molar glutamine to asparagine ratio of less than about 2, iii) a molar glutamine to total amino acid ratio of less than about 0.2, iv) a molar inorganic ion to total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and v) a combined glutamine and asparagine concentration greater than about 16 mM;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

72. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising steps of;

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a defined medium containing glutamine and having at least four medium characteristic selected from the group consisting of: i) a starting amino acid concentration greater than about 70 mM, ii) a molar glutamine to asparagine ratio of less than about 2, iii) a molar glutamine to total amino acid ratio of less than about 0.2, iv) a molar inorganic ion to total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and v) a combined glutamine and asparagine concentration greater than about 16 mM;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce within a

range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

73. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising steps of;

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a defined medium containing glutamine, characterized by: i) a starting amino acid concentration greater than about 70 mM, ii) a molar glutamine to asparagine ratio of less than about 2, iii) a molar glutamine to total amino acid ratio of less than about 0.2, iv) a molar inorganic ion to total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and v) a combined glutamine and asparagine concentration greater than about 16 mM;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that the polypeptide accumulates in the cell culture.

74. A method of producing a polypeptide in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising;

mammalian cells that contain a gene encoding a polypeptide of interest, which gene is expressed under condition of cell culture; and

a medium containing glutamine and having a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume of greater than about 16 mM;

maintaining said culture in an initial growth phase under a first set of culture conditions for a first period of time sufficient to allow said cells to reproduce within a range of about 20%-80% of the maximal possible viable cell density if said culture were maintained under the first set of culture conditions;

changing at least one of the culture conditions, so that a second set of culture conditions is applied;

maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that that the polypeptide accumulates in the cell culture.

75. The method of claim 1, wherein said medium comprises a medium containing glutamine and having a medium characteristic selected from the group consisting of:

(i) a starting amino acid concentration greater than about 70 mM, (ii) a molar starting glutamine to starting asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar starting glutamine to starting total amino acid ratio of less than about 0.2, (iv) a molar starting inorganic ion to starting total amino acid ratio between about 0.4 to 1, (v) a combined starting glutamine and starting asparagine concentration greater than about 16 mM, and combinations thereof.

76. The method of any one of claims 1-6 or 70-75, wherein:

lactate levels are lower than those levels observed under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic;

ammonium levels are lower than those levels observed under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic; and

total amount of produced polypeptide is at least as high as that observed under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.

77. The method of claim 1, wherein said culture is not supplemented with additional components over the course of producing said polypeptide.

78. The method of claim 1, wherein said culture is not supplemented with additional glutamine over the course of producing said polypeptide.

79. The method of claim 1, wherein the glutamine concentration in said culture is substantially depleted prior to said step of changing to a second set of culture conditions.

80. The method of claim 1, wherein the glutamine concentration in said culture is substantially depleted at approximately the same time as said step of changing to a second set of culture conditions.

81. The method of claim 1, wherein glycylglutamine is substituted for glutamine in said culture.

82. The method of claim 1, wherein said medium contains: (i) a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2, (iii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iv) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and (v) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume greater than about 16 mM.

83. The method of claim 1, wherein said medium contains: (i) a cumulative amino acid amount per unit volume greater than about 70 mM, (ii) a molar cumulative glutamine to cumulative total amino acid ratio of less than about 0.2, (iii) a molar cumulative inorganic ion to cumulative total amino acid ratio between about 0.4 to 1, and (iv) a combined cumulative amount of glutamine and asparagine per unit volume greater than about 16 a mM.

84. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 25 mM.

85. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mM.

86. The method of claim 1, wherein the initial total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 25 mM.

87. The method of claim 1, wherein the initial total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mM.

88. The method of claim 1, wherein said medium has a medium characteristic selected from the group consisting of:

(i) a cumulative total amount of histidine per unit volume greater than approximately 1.7 mM;

(ii) a cumulative total amount of isoleucine per unit volume greater than approximately 3.5 mM;

(iii) a cumulative total amount of leucine per unit volume greater than approximately 5.5 mM;

(iv) a cumulative total amount of methionine per unit volume greater than approximately 2.0 mM;

(v) a cumulative total amount of phenylalanine per unit volume greater than approximately 2.5 mM;

(vi) a cumulative total amount of proline per unit volume greater than approximately 2.5 mM;

(vii) a cumulative total amount of tryptophan per unit volume greater than approximately 1.0 mM;

(viii) a cumulative total amount of tyrosine per unit volume greater than approximately 2.0 mM; and

(ix) a cumulative total amount of proline per unit volume greater than approximately 2.5 mM.

89. The method of claim 1, wherein said medium has a medium characteristic selected from the group consisting of:

(i) an initial amount of histidine per unit volume greater than approximately 1.7 mM;

(ii) an initial amount of isoleucine per unit volume greater than approximately 3.5 mM;

(iii) an initial amount of leucine per unit volume greater than approximately 5.5 mM;

(iv) an initial amount of methionine per unit volume greater than approximately 2.0 mM;

(v) an initial amount of phenylalanine per unit volume greater than approximately 2.5 mM;

(vi) an initial amount of proline per unit volume reater than approximately 2.5 mM;

(vii) an initial amount of tryptophan per unit volume greater than approximately 1.0 mM;

(viii) an initial amount of tyrosine per unit volume greater than approximately 2.0 mM; and

(ix) an initial amount of proline per unit volume greater than approximately 2.5 mM.

90. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of serine per unit volume in said medium is greater than approximately 7 mM.

91. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of serine per unit volume in said medium is greater than approximately 10 mM.

92. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 8 mM.

93. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 12 mM.

94. The method of claim 1, wherein the initial total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 8 mM.

95. The method of claim 1, wherein the initial total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 12 mM.

96. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of phosphorous per unit volume in said medium is greater than approximately 2.5 mM.

97. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of phosphorous per unit volume in said medium is greater than approximately 5 mM.

98. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of glutamate per unit volume in said medium is less than approximately 1 mM.

99. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of calcium pantothenate per unit volume in said medium is greater than approximately 8 mg/L.

100. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of calcium pantothenate per unit volume in said medium is greater than approximately 20 mg/L.

101. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of nicotinamide per unit volume in said medium is greater than approximately 7 mg/L.

102. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of nicotinamide per unit volume in said medium is greater than approximately 25 mg/L.

103. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of pyridoxine and pyridoxal per unit volume in said medium is greater than approximately 5 mg/L.

104. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of pyridoxine and pyridoxal per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mg/L.

105. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of riboflavin per unit volume in said medium is greater than approximately 1.0 mg/L.

106. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of riboflavin per unit volume in said medium is greater than approximately 2.0 mg/L.

107. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of thiamine hydrochloride per unit volume in said medium is greater than approximately 7 mg/L.

108. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of thiamine hydrochloride per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mg/L.

109. The method of any of claims 1-23 or claims 25-75 or claims 77-108, wherein the polypeptide is anti-GDF-8.

110. The method of any of claims 1-23 or claims 25-75 or claims 77-108, wherein the polypeptide is anti-LewY.

111. The method of claim 24, wherein the polypeptide is anti-GDF-8.

112. The method of claim 24, wherein the polypeptide is anti-LewY.

113. The method of claim 76, wherein the polypeptide is anti-GDF-8.

114. The method of claim 76, wherein the polypeptide is anti-LewY.

Figure 1. Comparison of Medium 1 and Medium 2 in shake flasks using anti-GDF-8 cells.

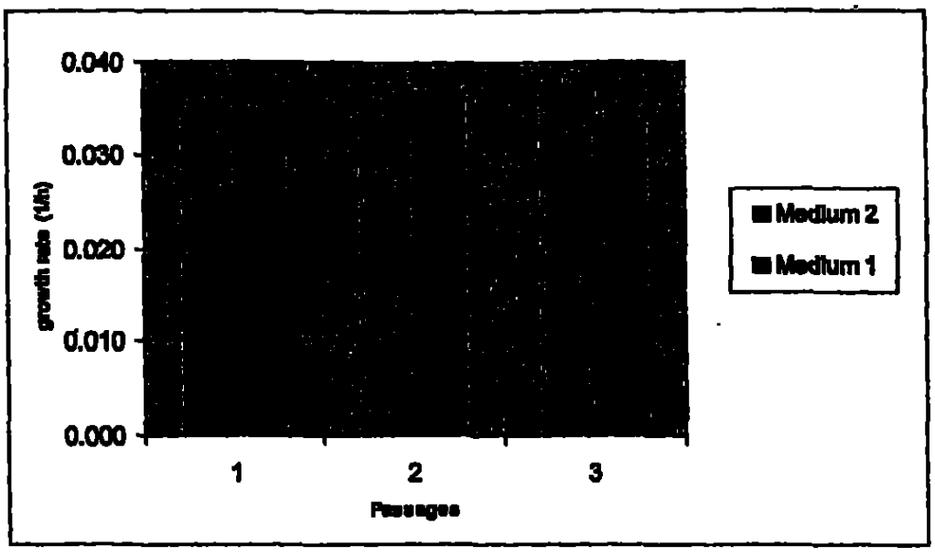


Figure 2. Cell growth and viability of anti-GDF-8 cells in Medium 1.

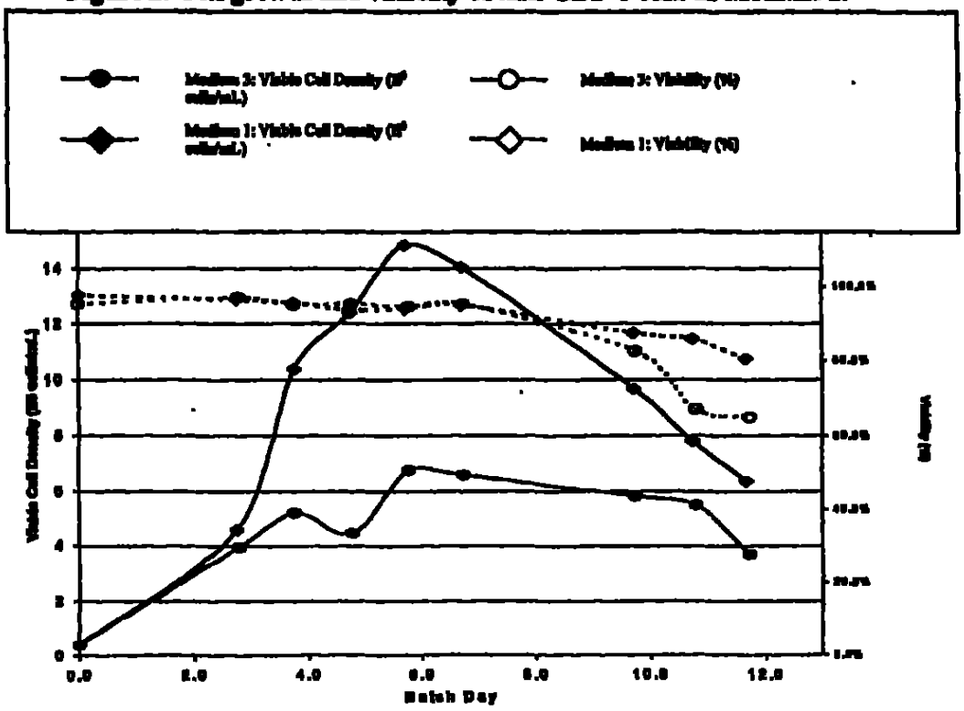


Figure 3. Cell growth of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

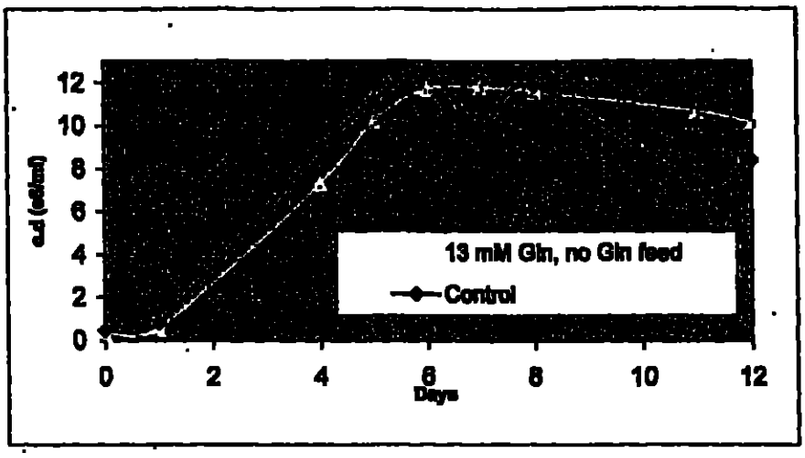


Figure 4. Cell viability of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

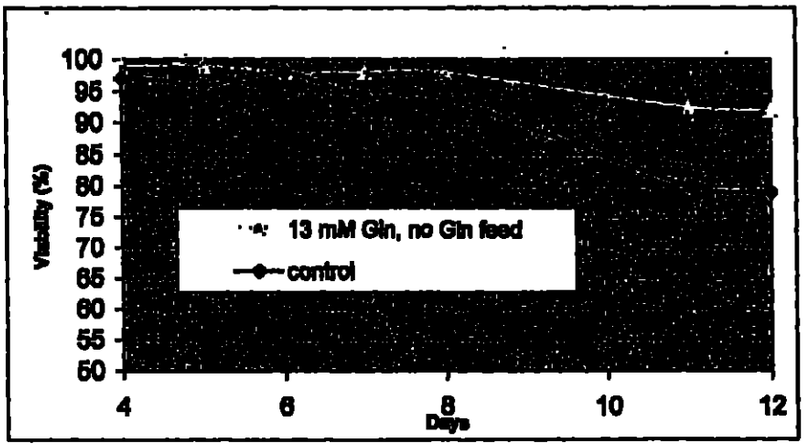


Figure 5. Ammonium levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

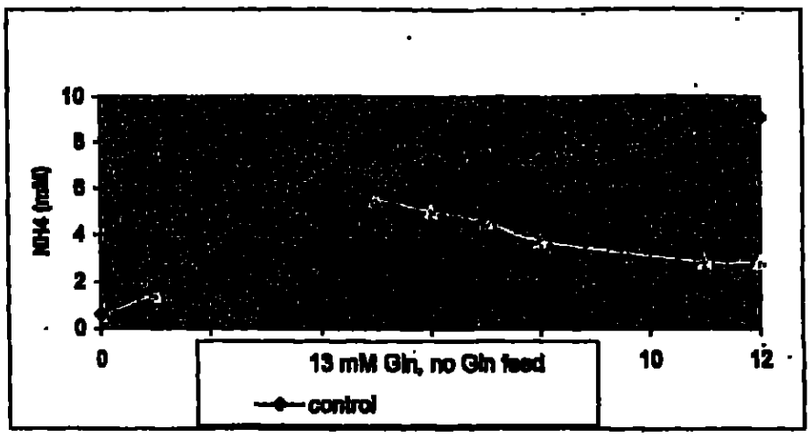


Figure 6. Lactate levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and no glutamine feed culture conditions.

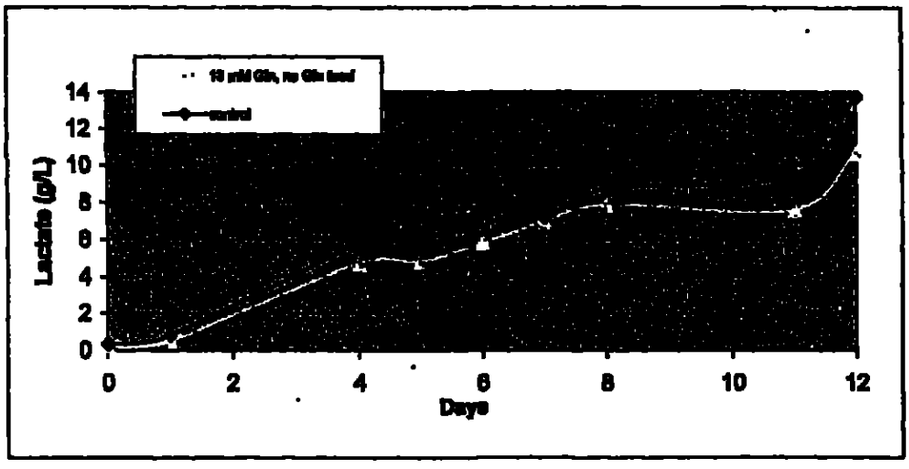


Figure 7. Anti-GDF-8 titer in control and no glutamine feed culture conditions.

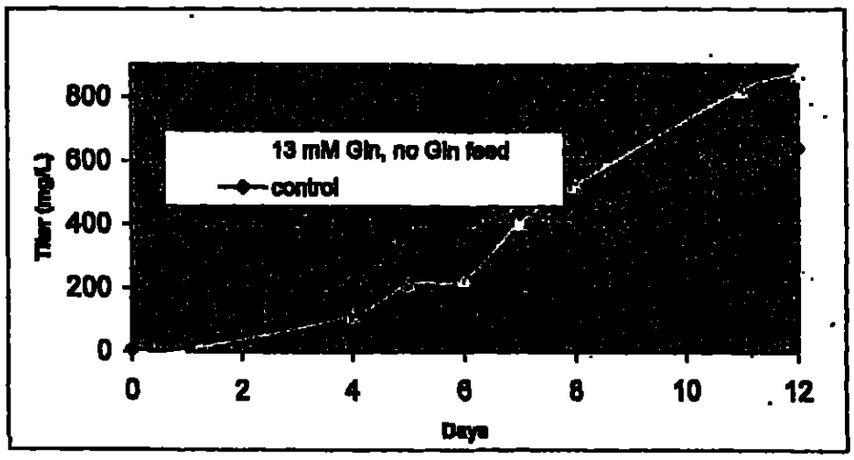


Figure 8. Cell density of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved feed culture conditions.

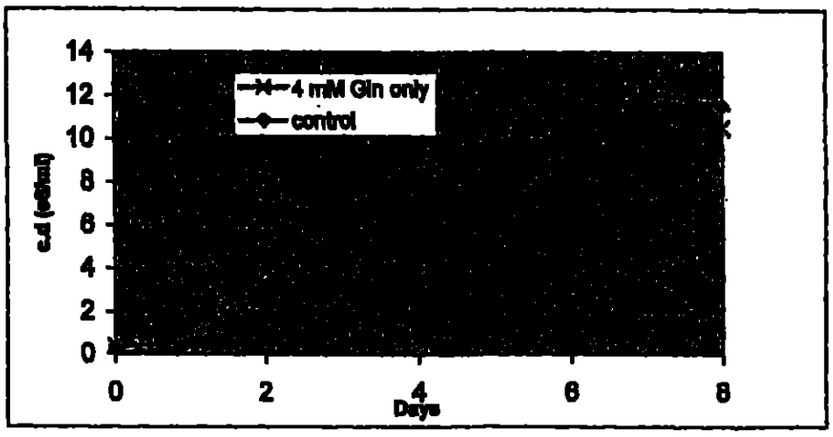


Figure 9. Cell viability of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved feed culture conditions.

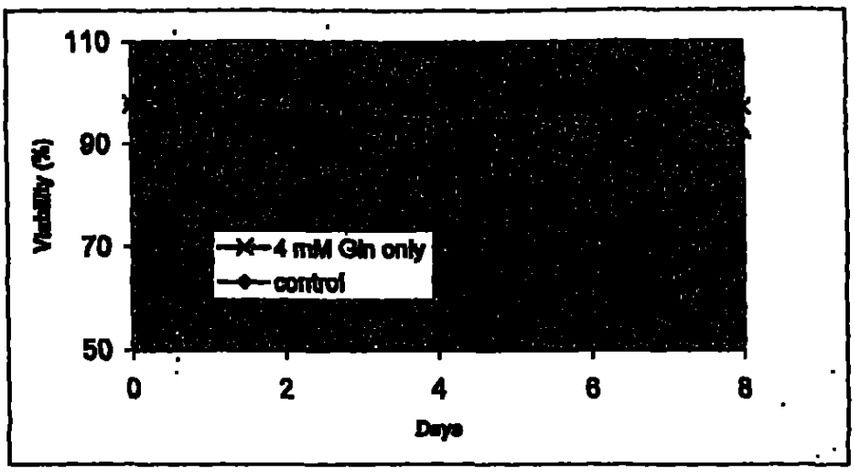


Figure 10. Ammonium levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved culture conditions.

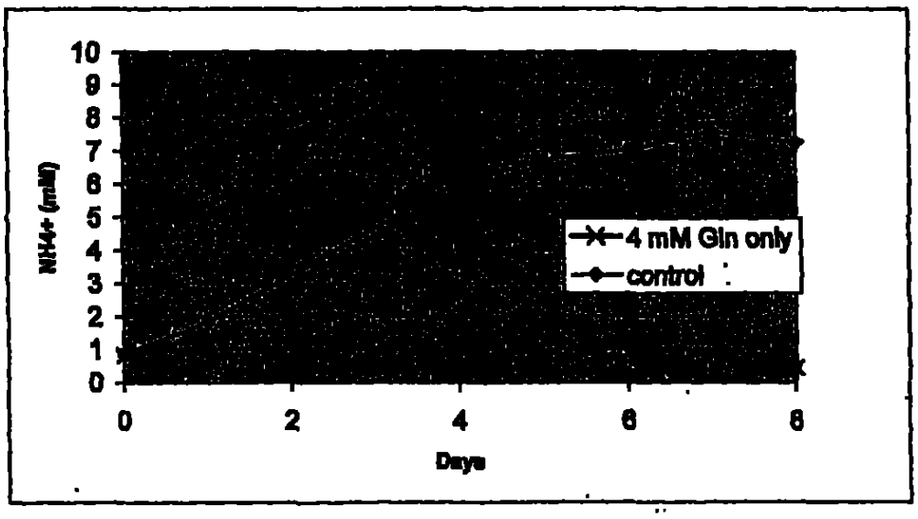


Figure 11. Lactate levels of anti-GDF-8 cell cultures in control and glutamine-starved culture conditions.

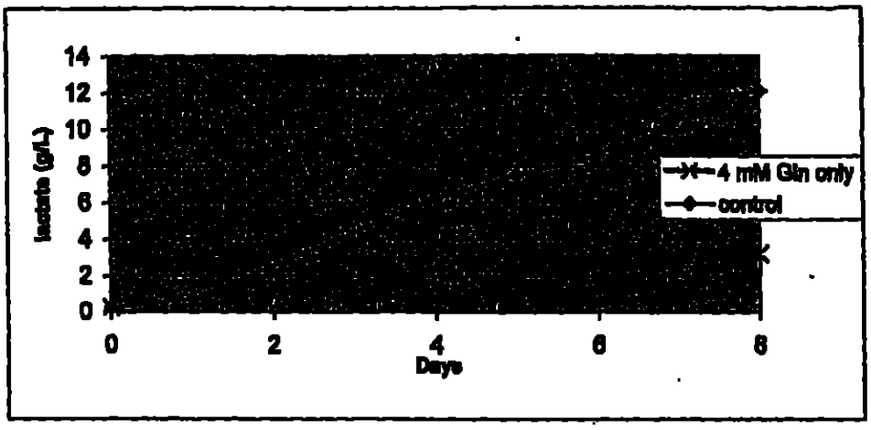
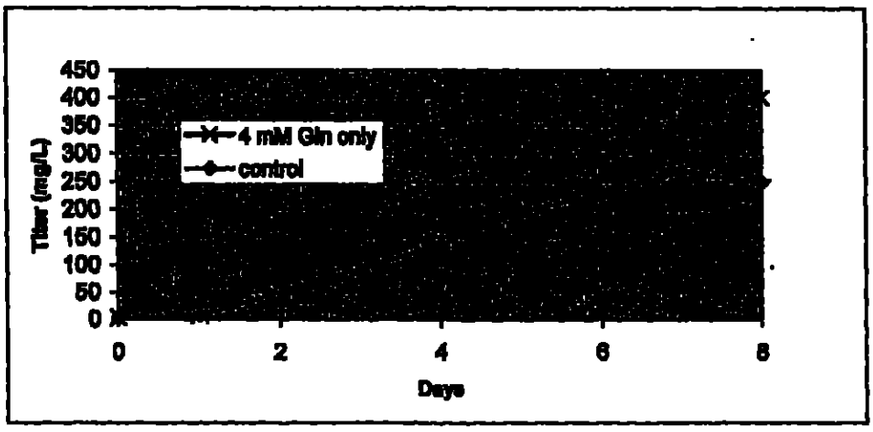


Figure 12. Anti-GDF-8 titer in control and glutamine-starved culture conditions.



116

00116

Figure 13. Iron dose response of anti-GDF-8 cells in Medium 1 and Medium 2.

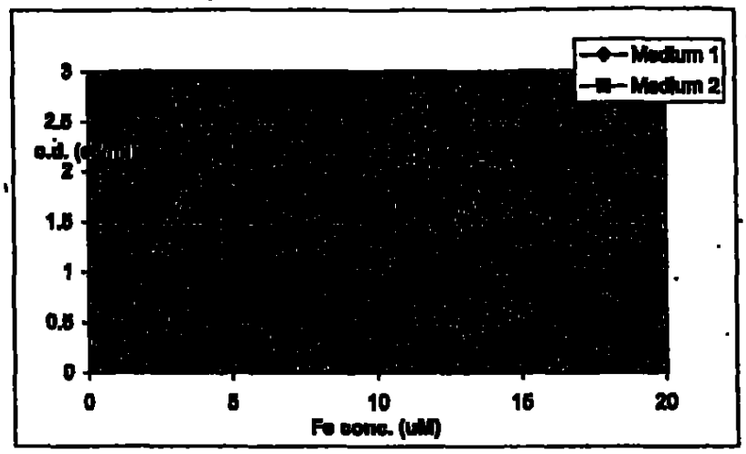


Figure 14. Cell density of Glutamate and Glutamine fed cultures.

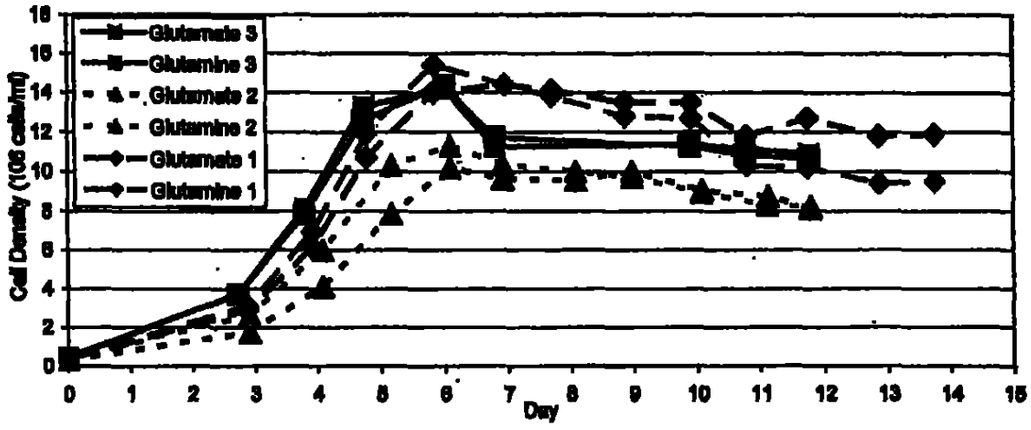


Figure 15. Cell viability of Glutamate and Glutamine fed cultures.

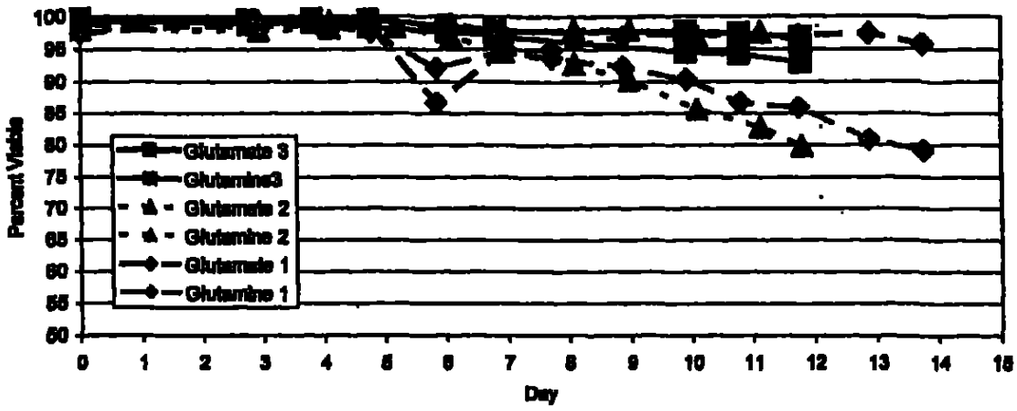


Figure 16. Anti-Lewis Y titer in Glutamate and Glutamine fed cultures.

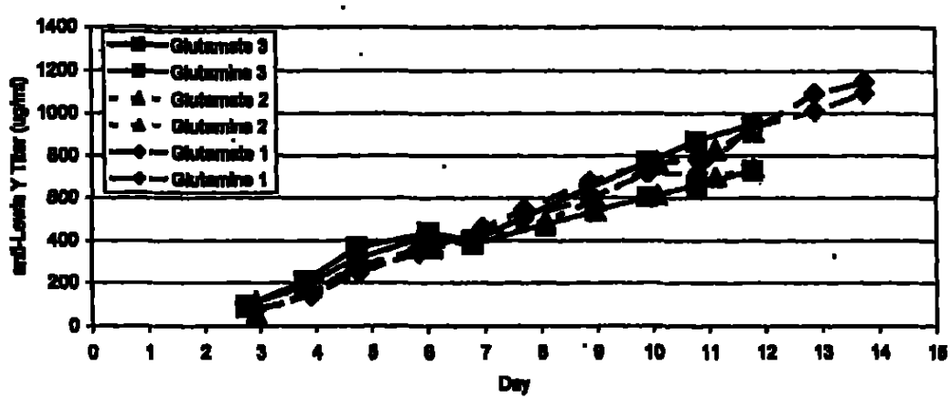


Figure 17. Lactate levels in Glutamate and Glutamine fed cultures.

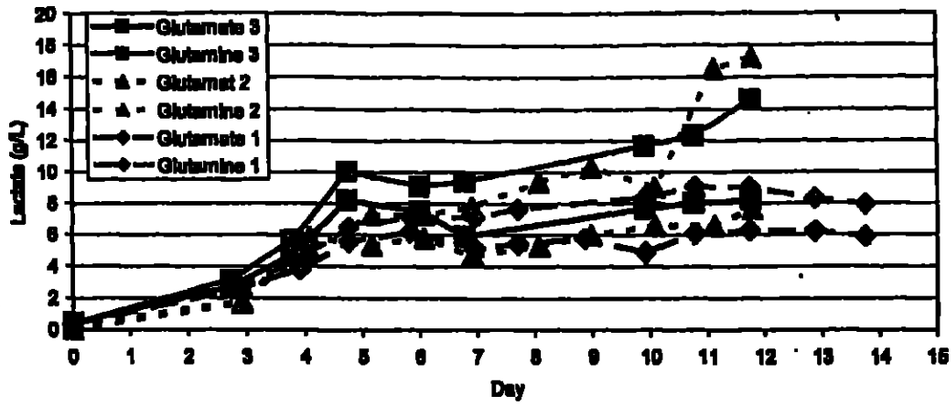


Figure 18. Ammonium levels in Glutamate and Glutamine fed cultures.

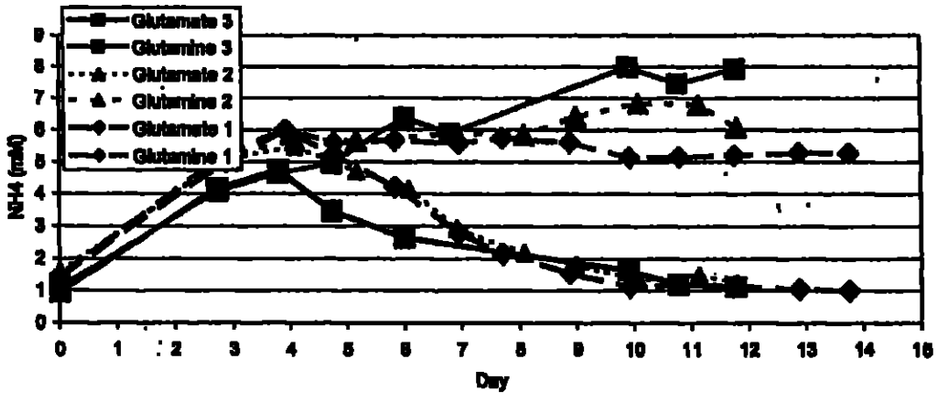


Figure 19. Osmolarity of Glutamate and Glutamine fed cultures.

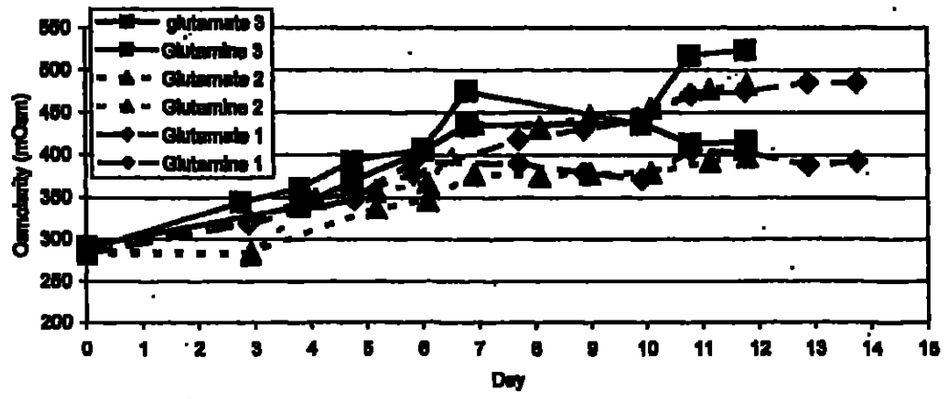


Figure 20. Cell Density. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

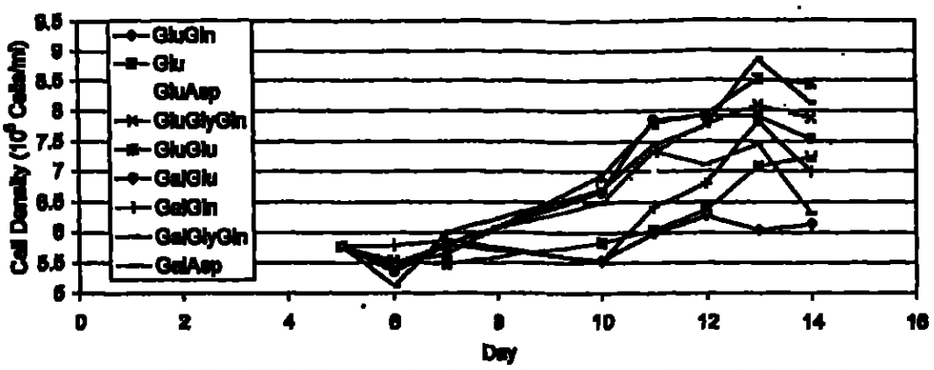


Figure 21. Cell Viability. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

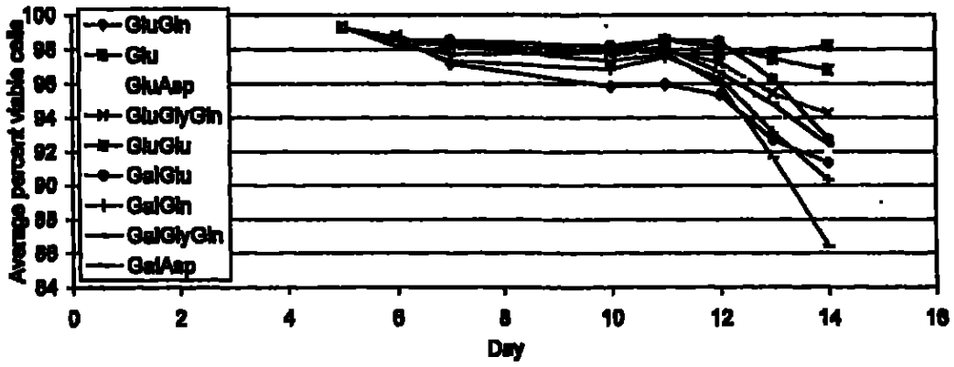


Figure 22. Average Titer. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

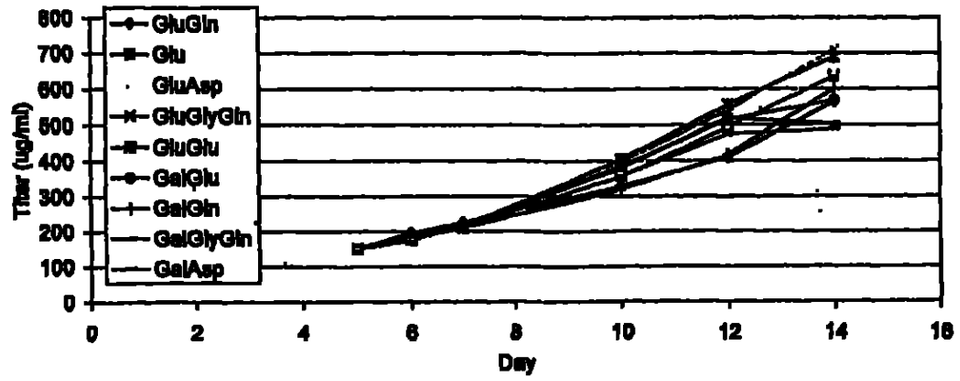


Figure 23. Ammonium levels. Each plot is the average of two shake flasks grown using the same conditions.

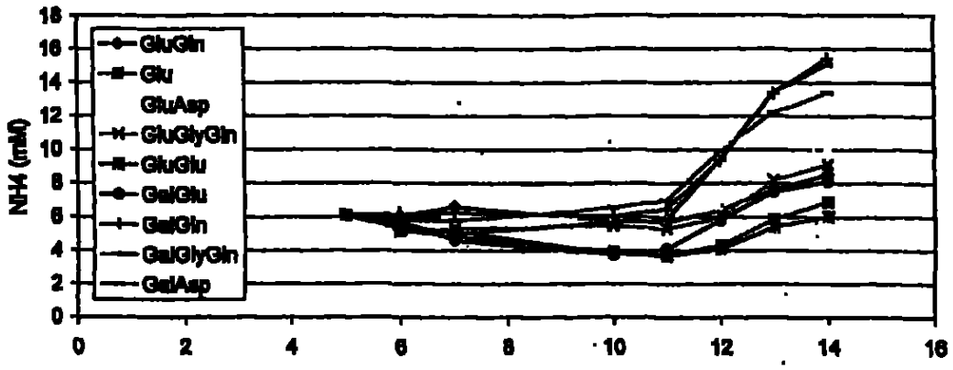
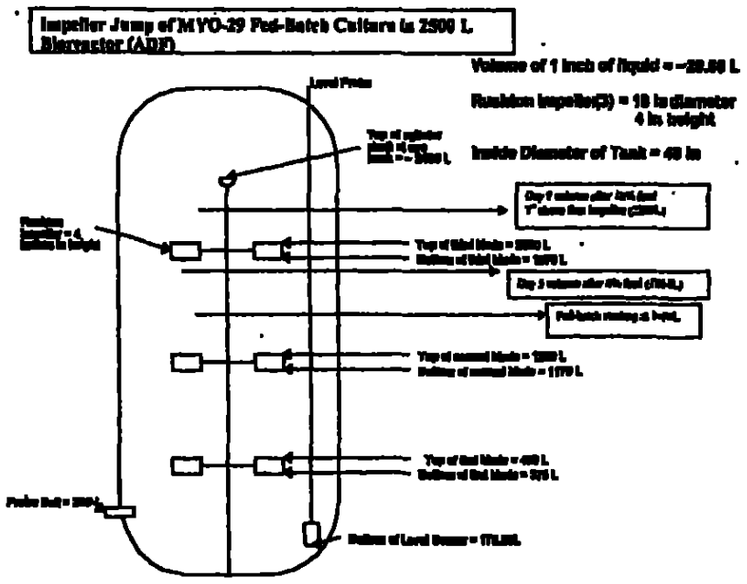


Figure 24. Impeller Jump



121

Figure 25. Cell growth of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.

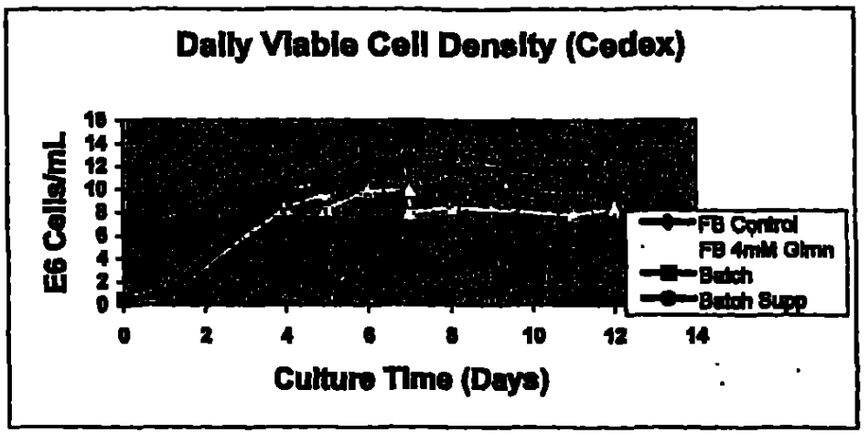
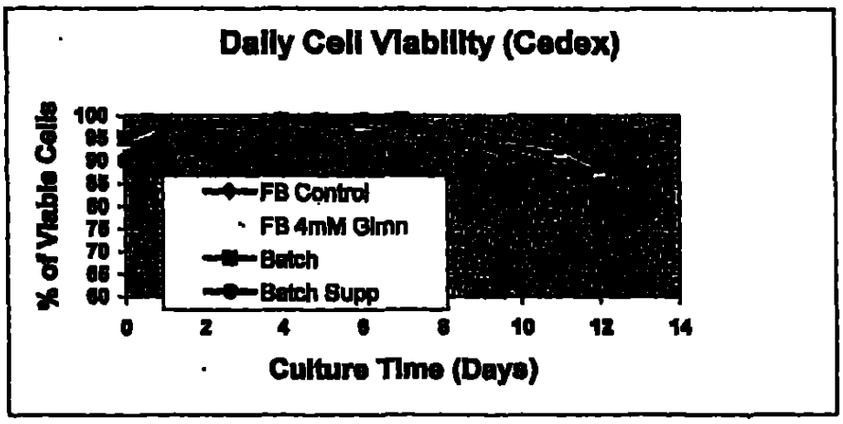


Figure 26. Viability of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.



122

Figure 27. Anti-GDF-8 titer under various experimental conditions.

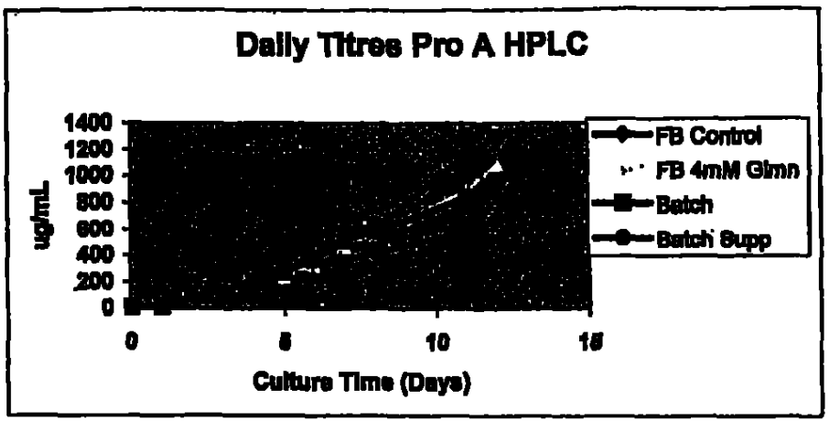
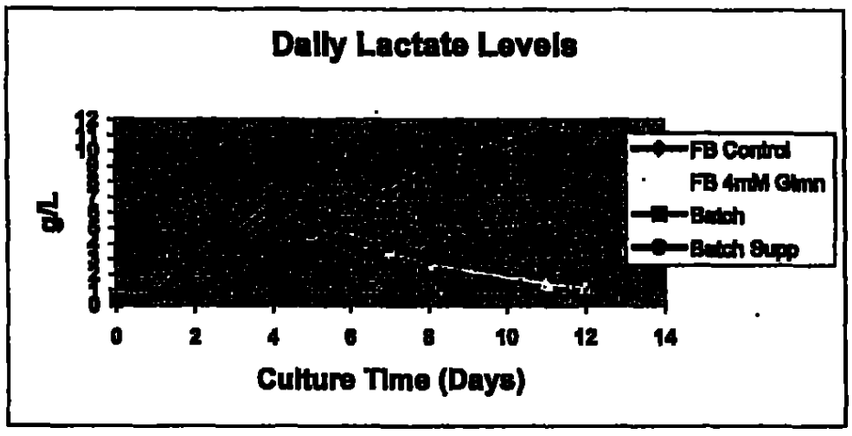


Figure 28. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.



123

00123

Figure 29. Ammonium levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

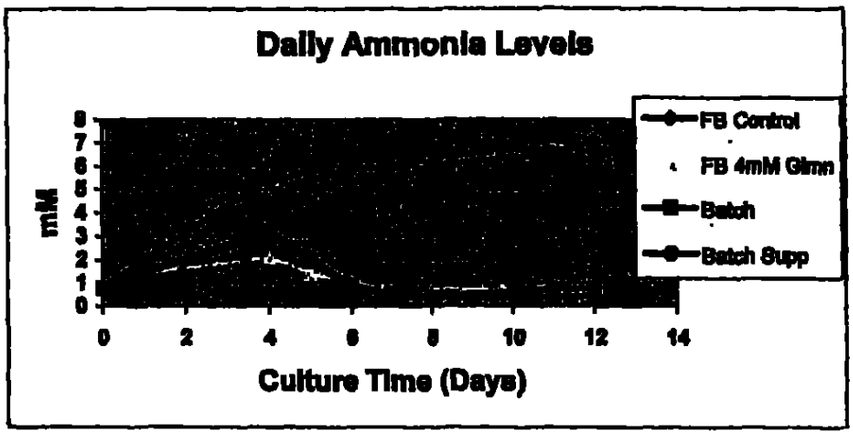


Figure 30. Cell growth of anti-GDF-8 cells under various experimental conditions.

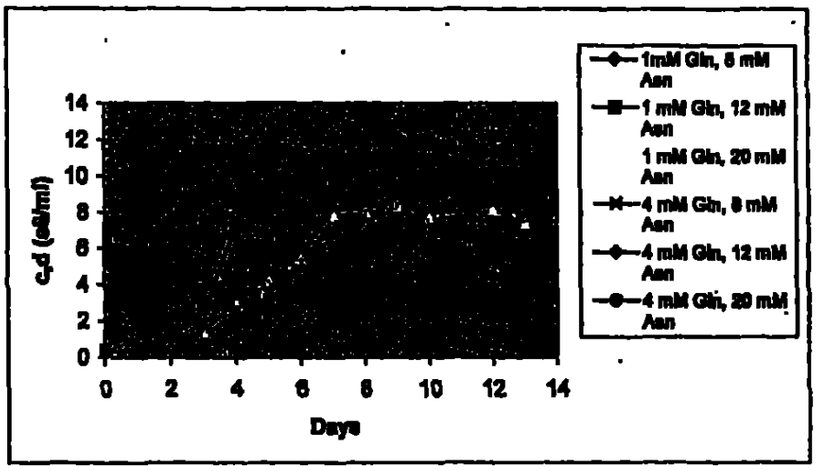


Figure 31. Anti-GDF-8 titer under various experimental conditions.

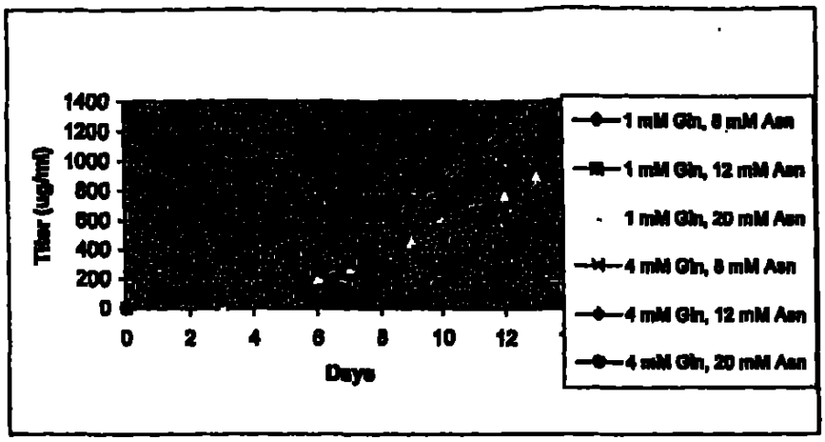


Figure 32. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

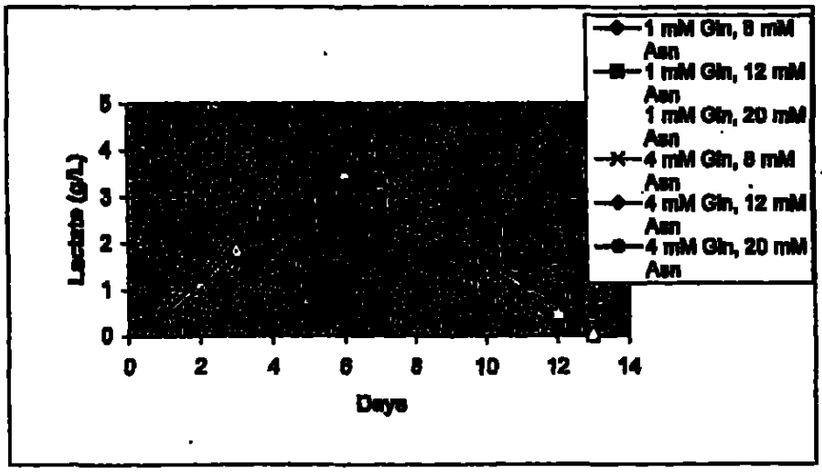


Figure 33. Ammonium levels of anti-GDF-8 cultures under various experimental conditions.

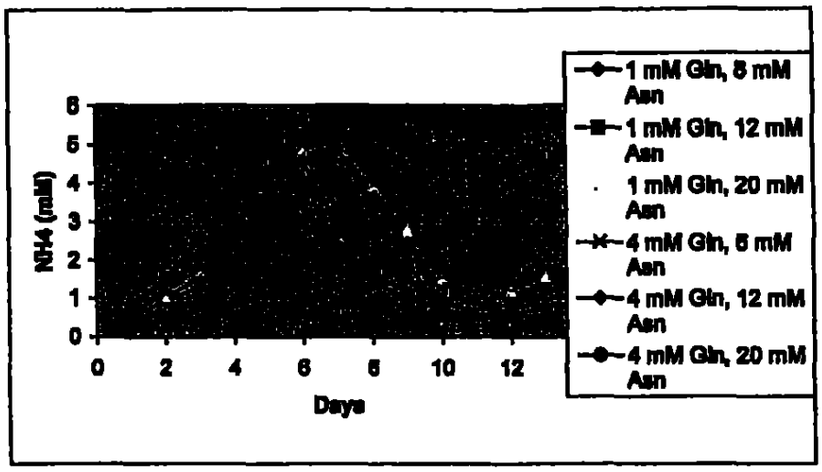
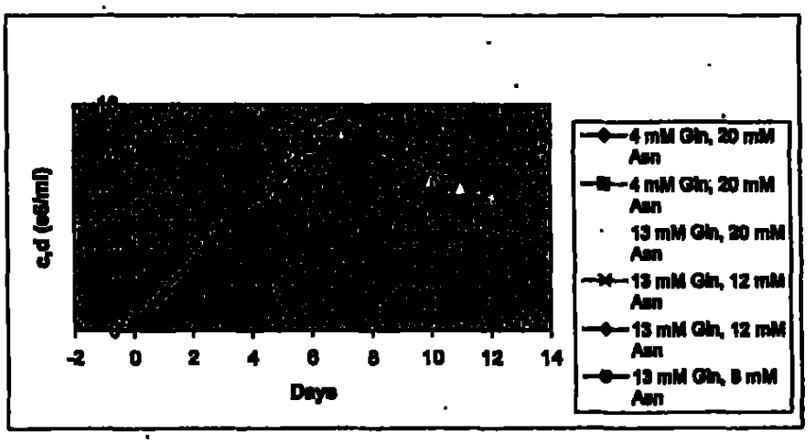


Figure 34. Cell growth of anti-GDF-8 cells in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.



126

00126

Figure 35. Cell viability of anti-GDF-8 cells in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

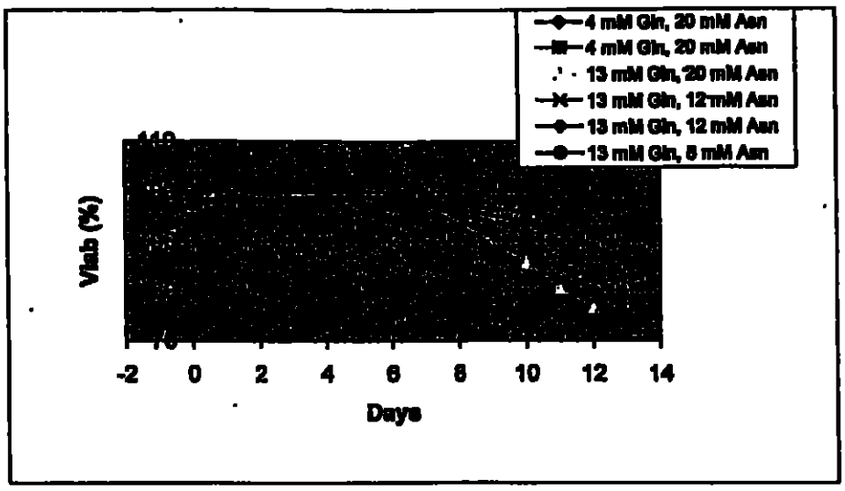
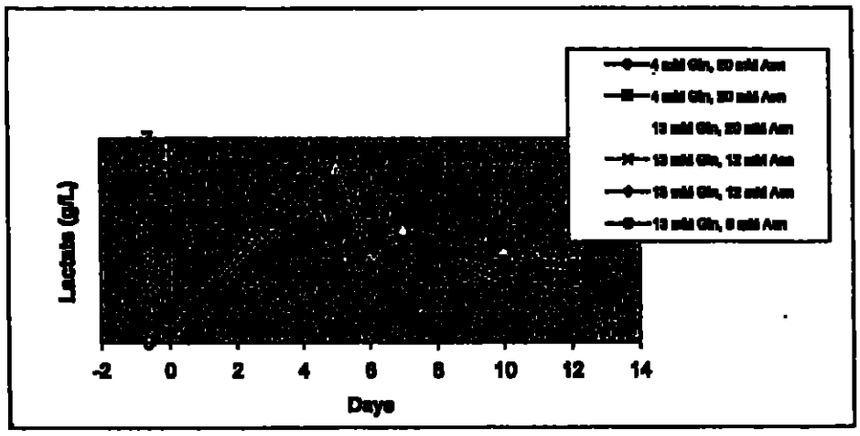


Figure 36. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.



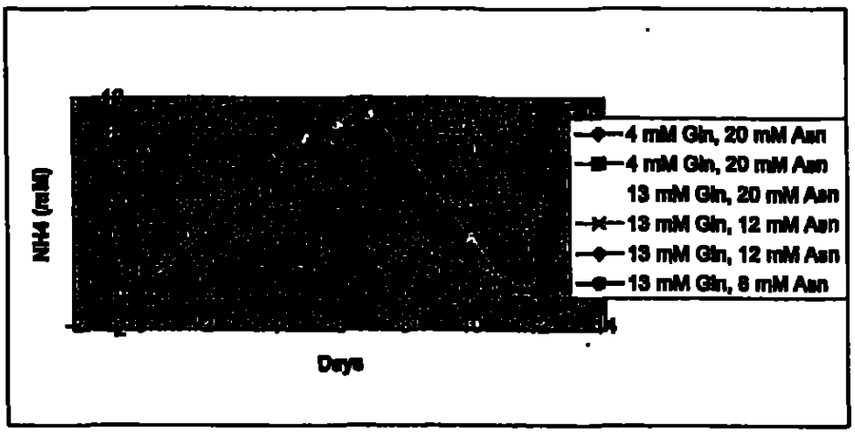


Figure 38. Glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

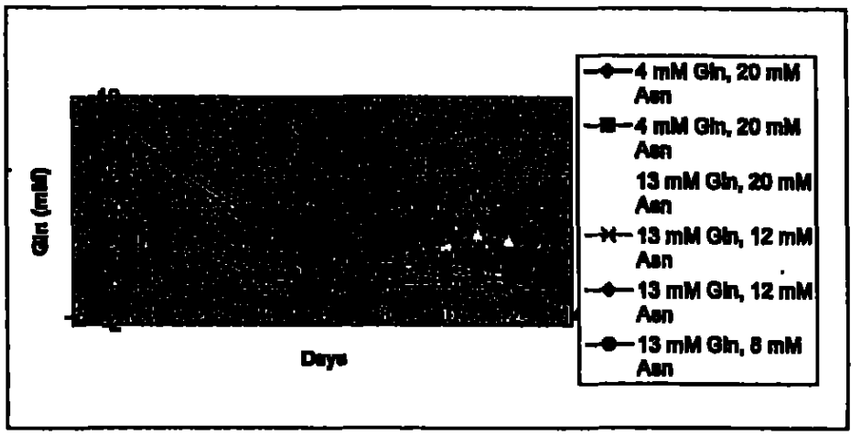


Figure 39. Anti-GDF-8 titer in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

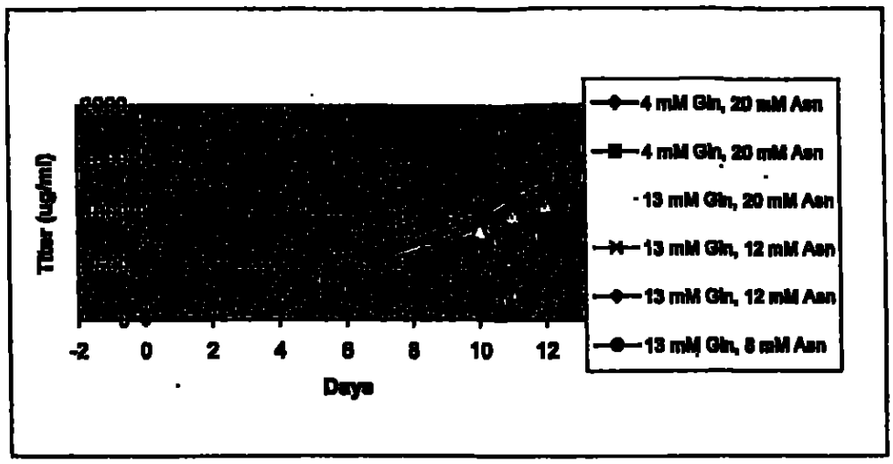


Figure 40. Osmolarity of anti-GDF-8 cultures in modified Medium 9 containing various levels of glutamine and asparagine.

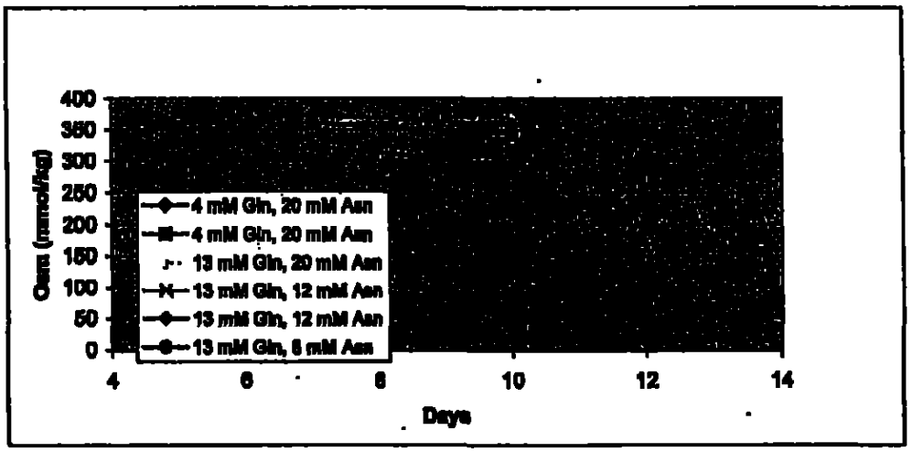


Figure 41. Cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of asparagine and cysteine.

129

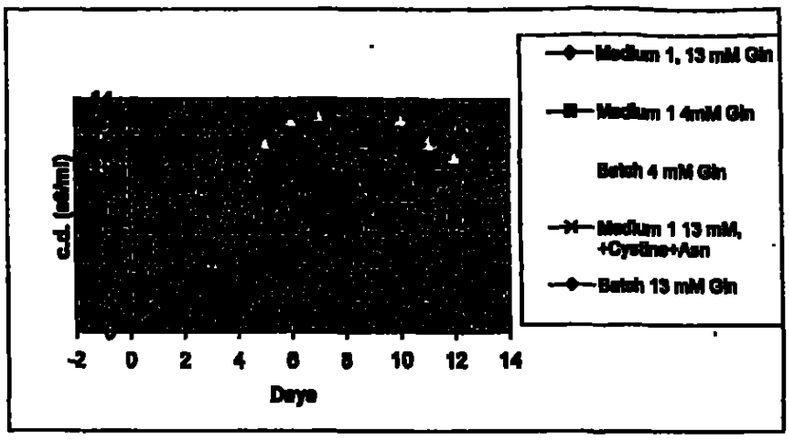


Figure 42. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

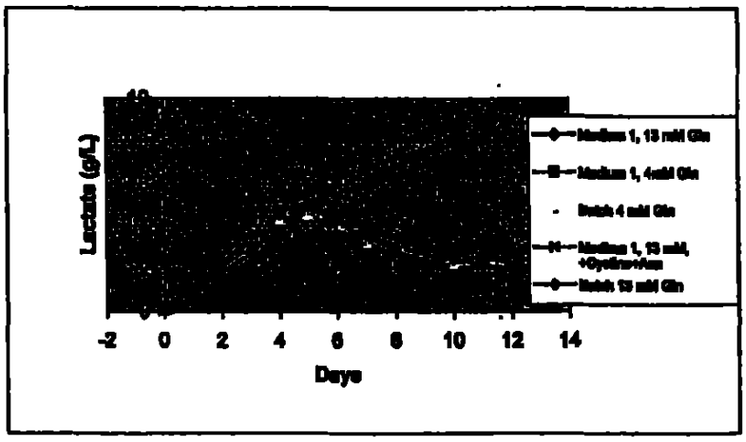


Figure 43. Ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

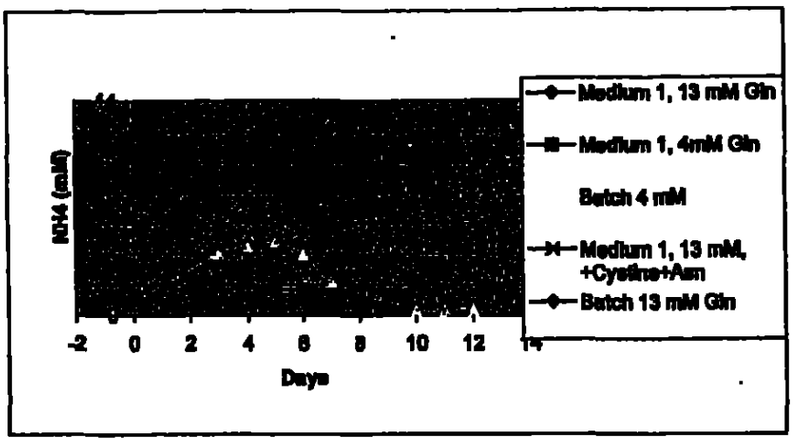


Figure 44. Glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cystine.

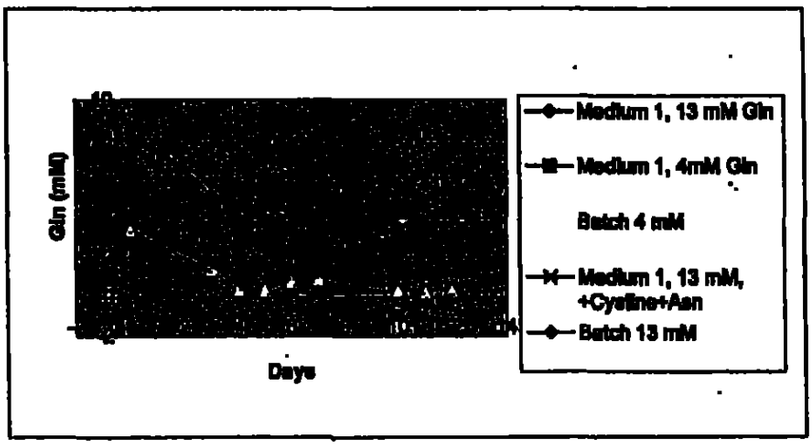


Figure 45. Glutamate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cystine.

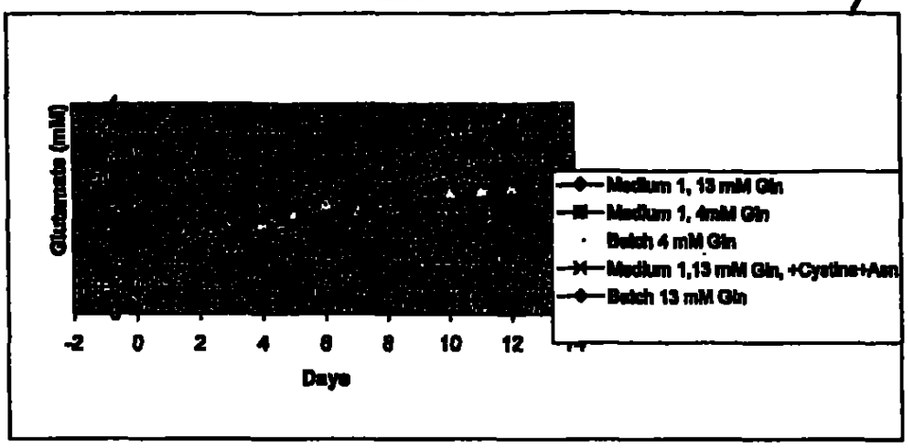


Figure 46. Anti-GDF-8 titer in media containing various levels of asparagine and cysteine.

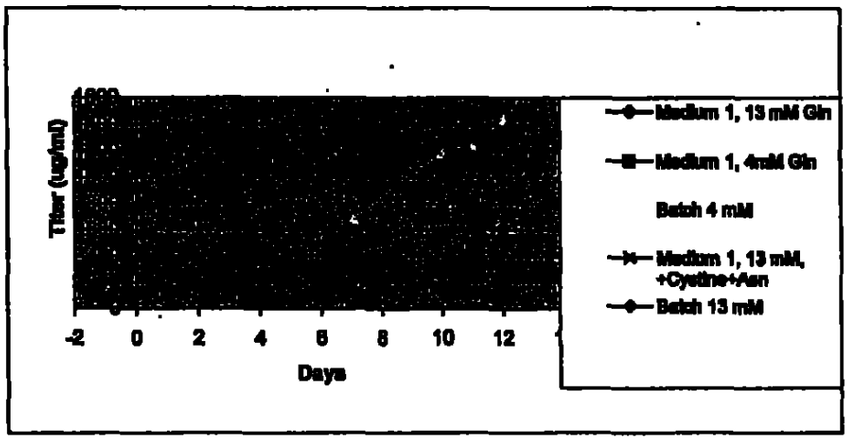


Figure 47. Osmolarity of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of asparagine and cysteine.

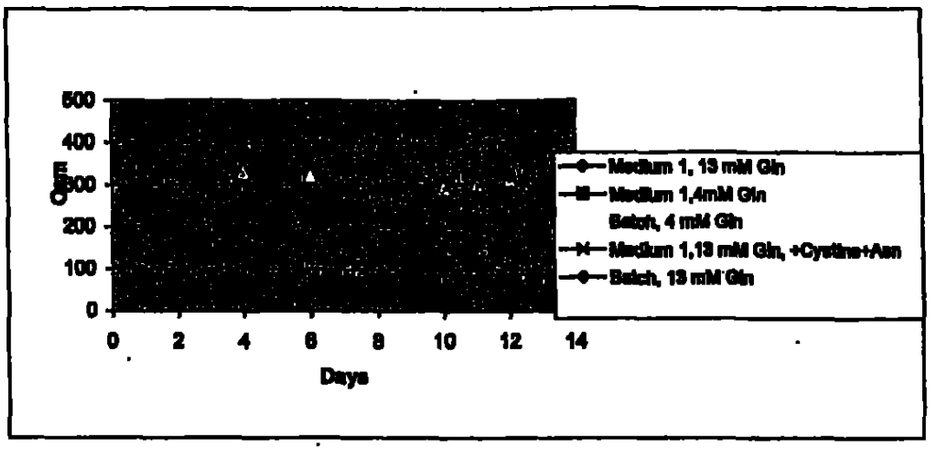


Figure 48. Cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of amino acids and vitamins.

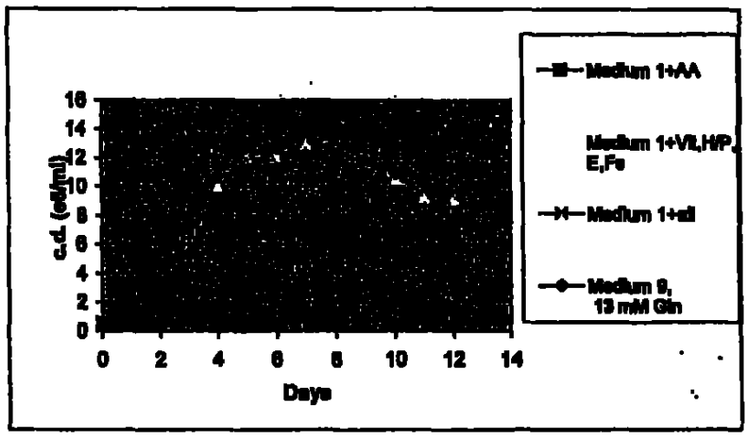


Figure 49. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

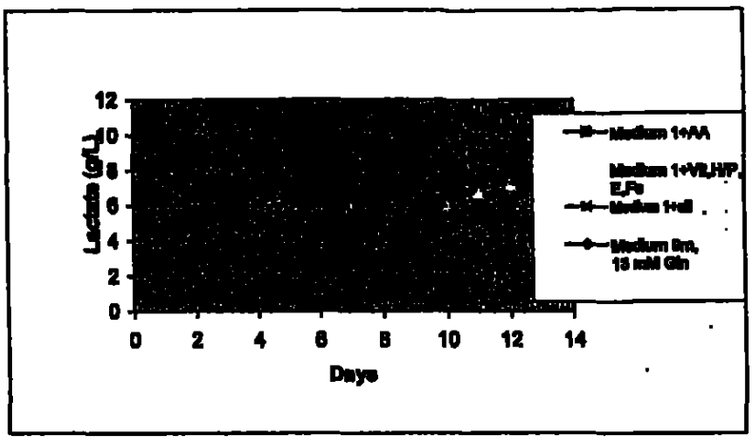


Figure 50. Ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

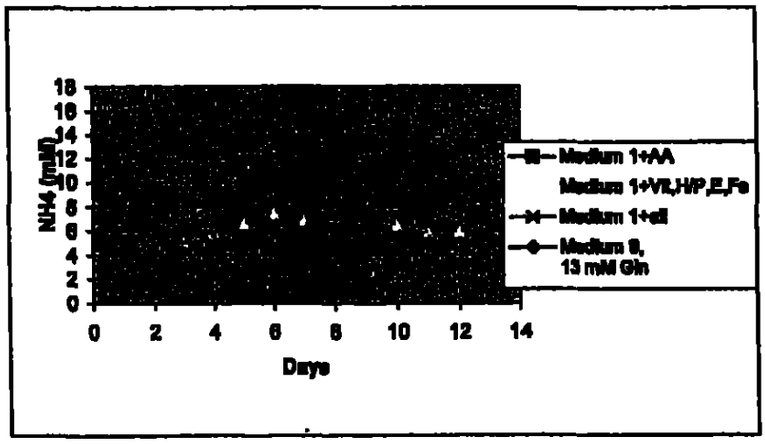


Figure 51. Glutamine levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of amino acids and vitamins.

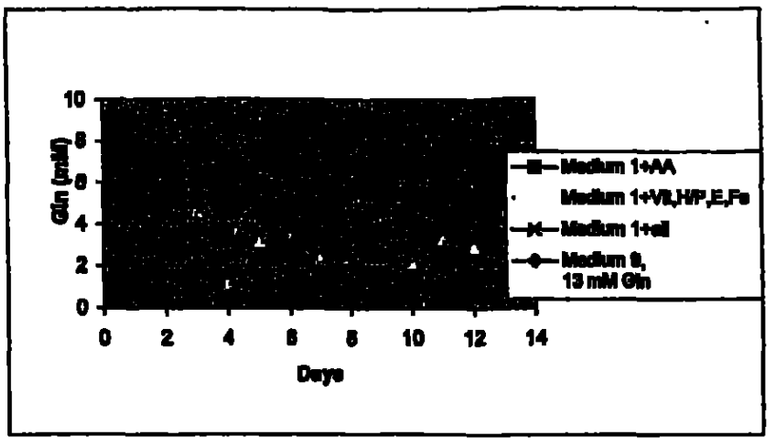


Figure 52. anti-GDF-8 titer in media containing various levels of amino acids and vitamins.

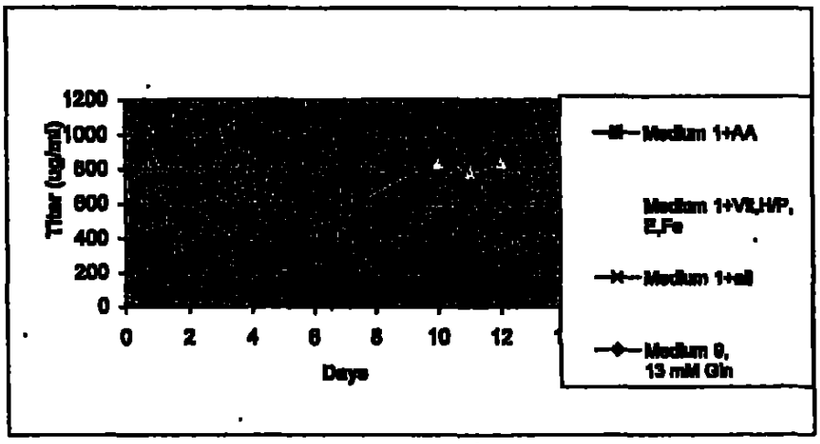


Figure 53. Cell growth of anti-GDF-8 cells in media containing various levels of vitamins, trace elements E and iron.

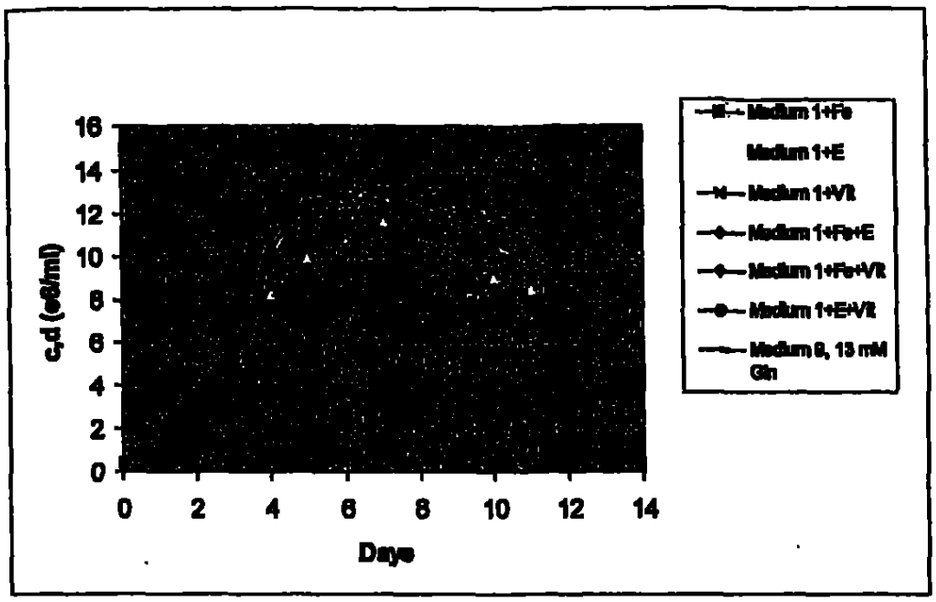


Figure 54. Lactate levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of vitamins, trace elements E and iron.

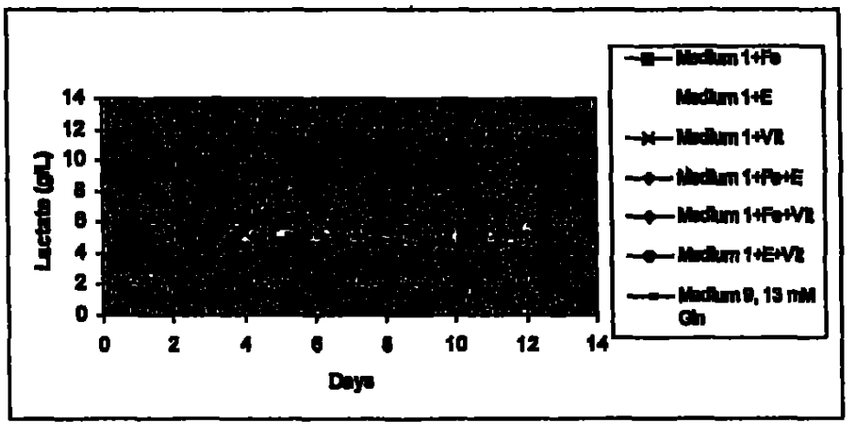


Figure 55. Ammonium levels of anti-GDF-8 cultures in media containing various levels of vitamins, trace elements E and iron.

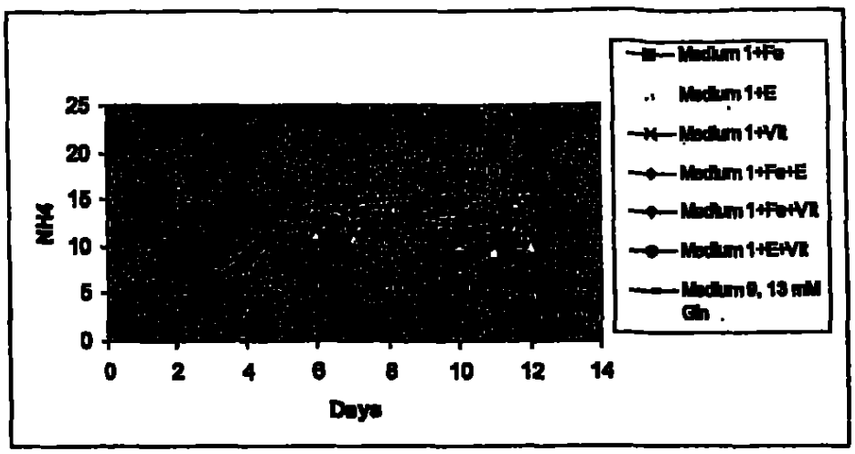


Figure 56. Anti-GDF-8 titer in media containing various levels of vitamins, trace elements E and iron.

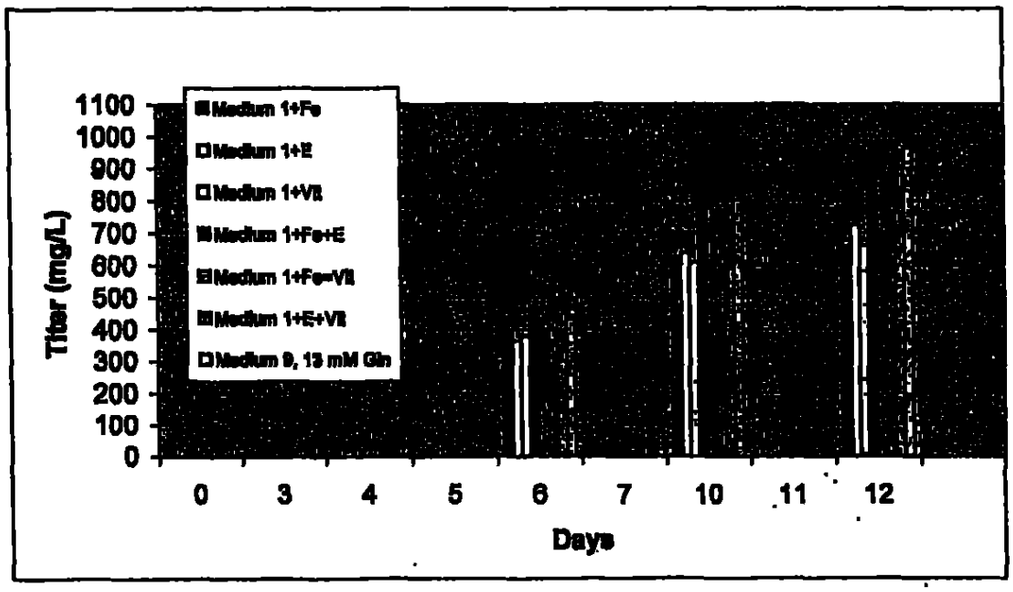


Figure 57. Cell growth of anti-GDF-8 cells in Mediums 1, 3 and 9.

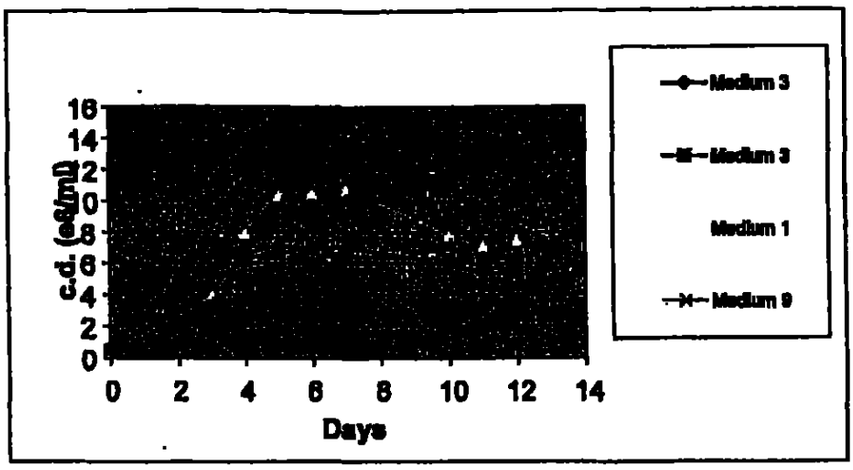


Figure 58. Anti-GDF-8 titer in Mediums 1, 3 and 9.

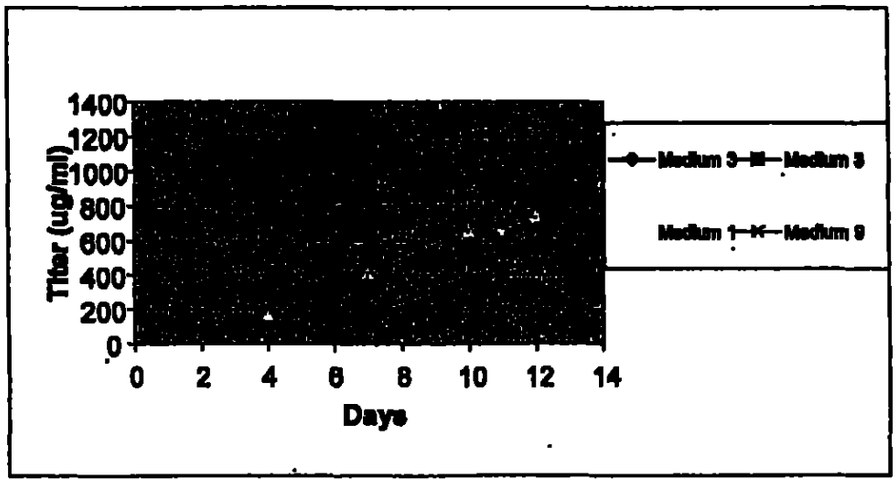


Figure 59. Extrapolated anti-GDF-8 titers for various levels of glutamine alone and total combined glutamine and asparagine.

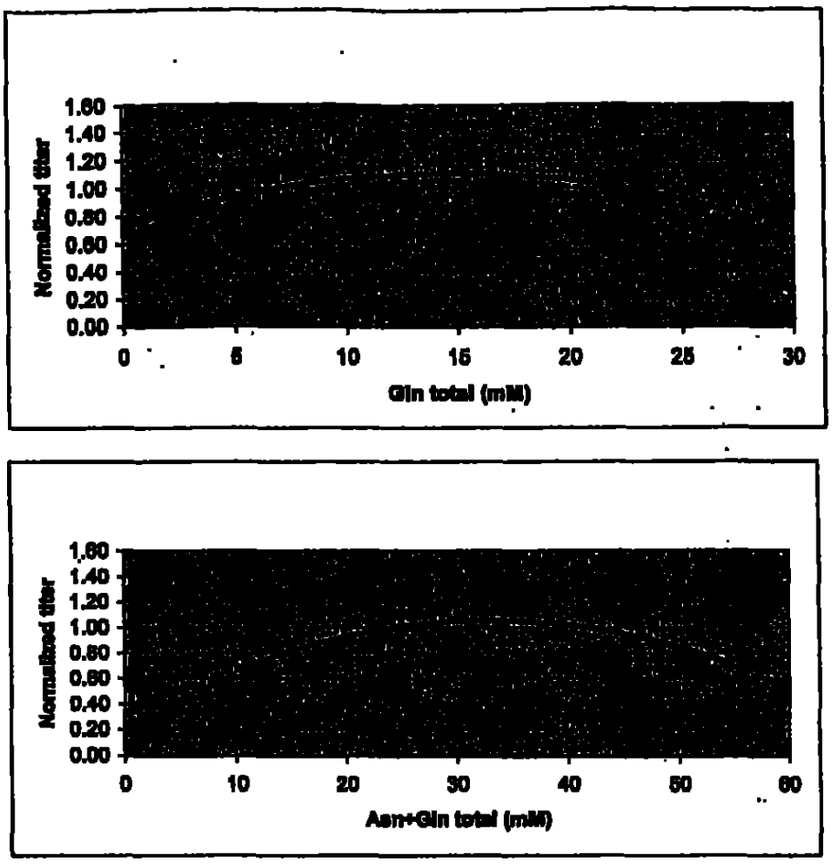


Figure 60. Growth of anti-ABeta cells under various media conditions tested.

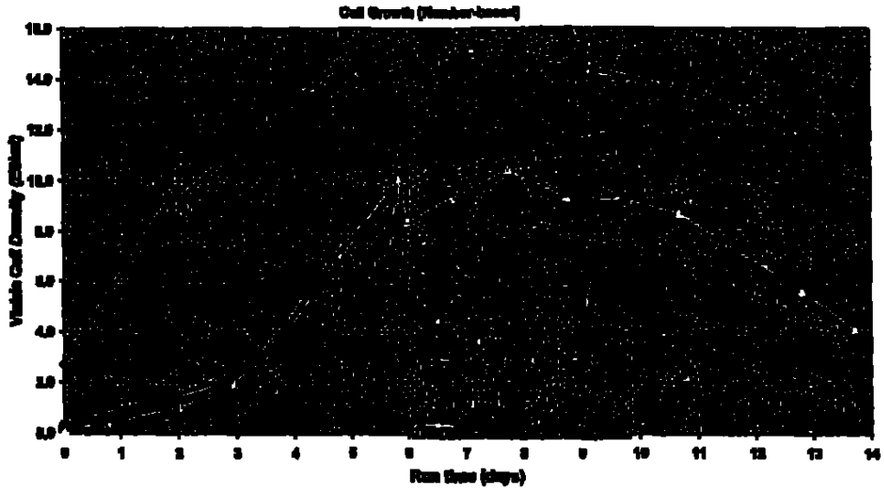


Figure 61. Viability of anti-ABeta cells under various media conditions tested.

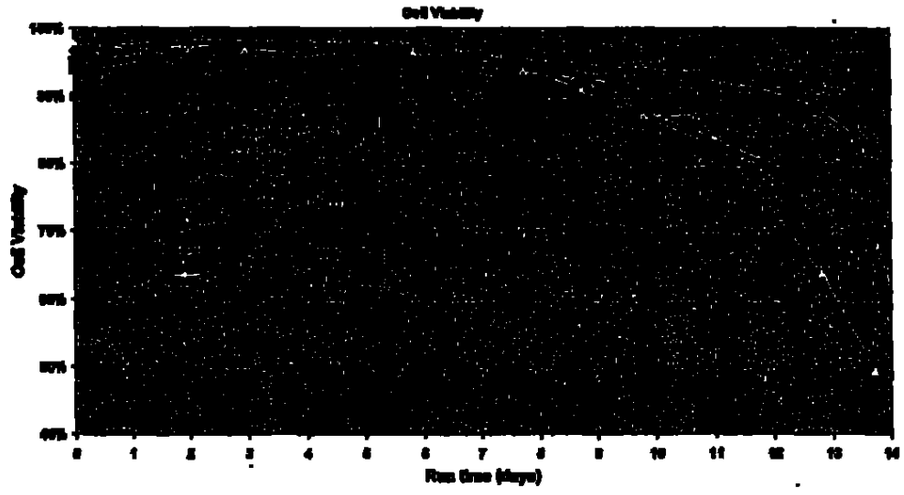


Figure 62. Lactate levels of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

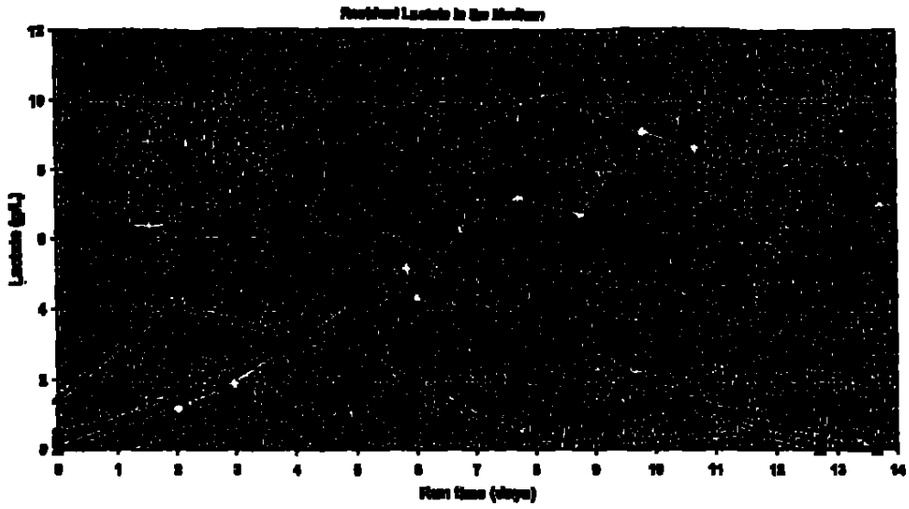


Figure 63. Ammonium levels of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

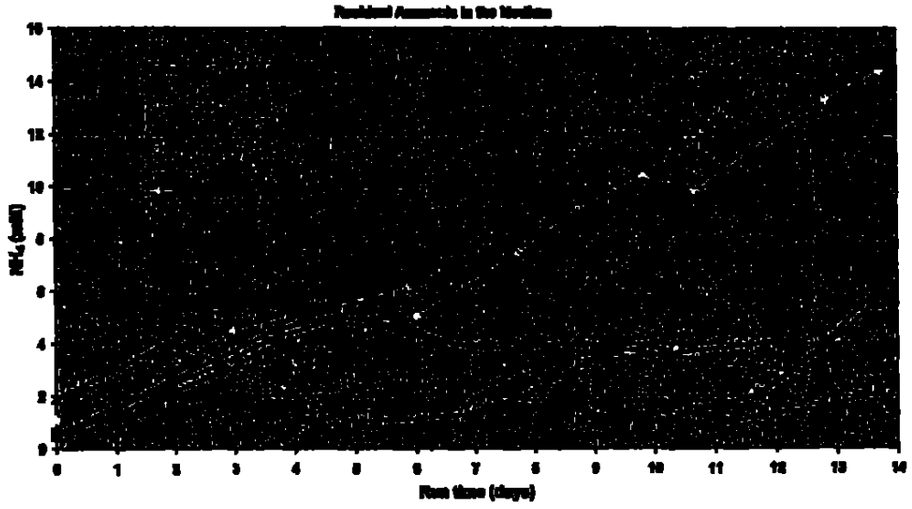


Figure 64. Anti-ABeta titer in various media conditions tested.

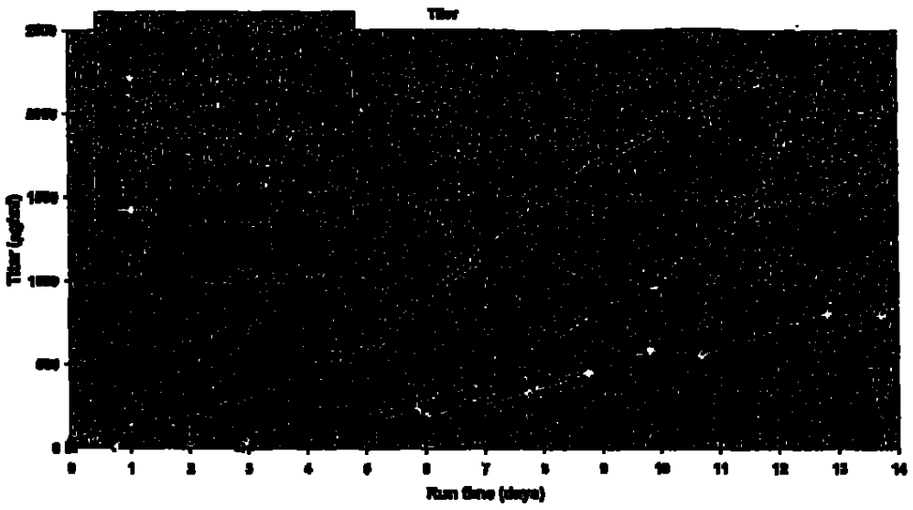


Figure 65. Osmolarity of anti-ABeta cultures under various media conditions tested.

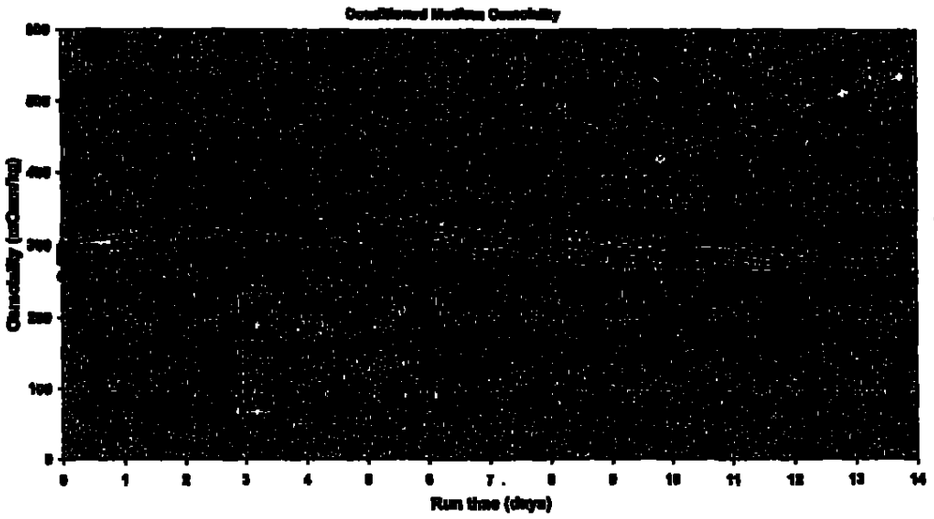


Figure 66. Growth of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

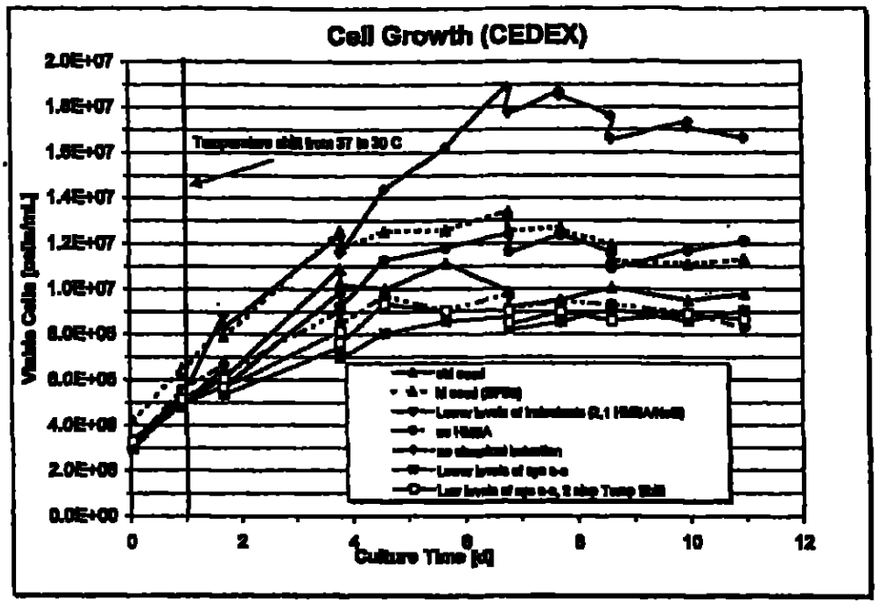


Figure 67. Viability of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

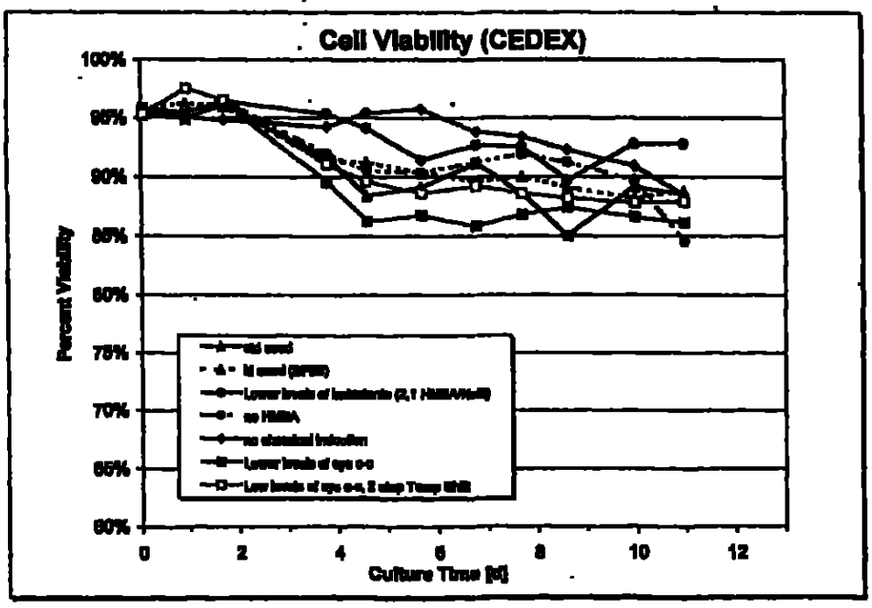


Figure 68. Residual glucose in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

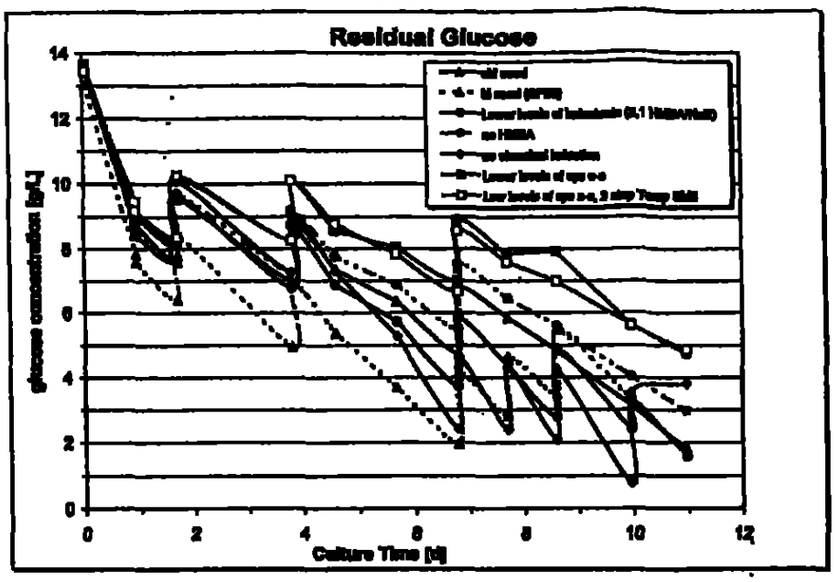


Figure 69. Glutamine levels in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

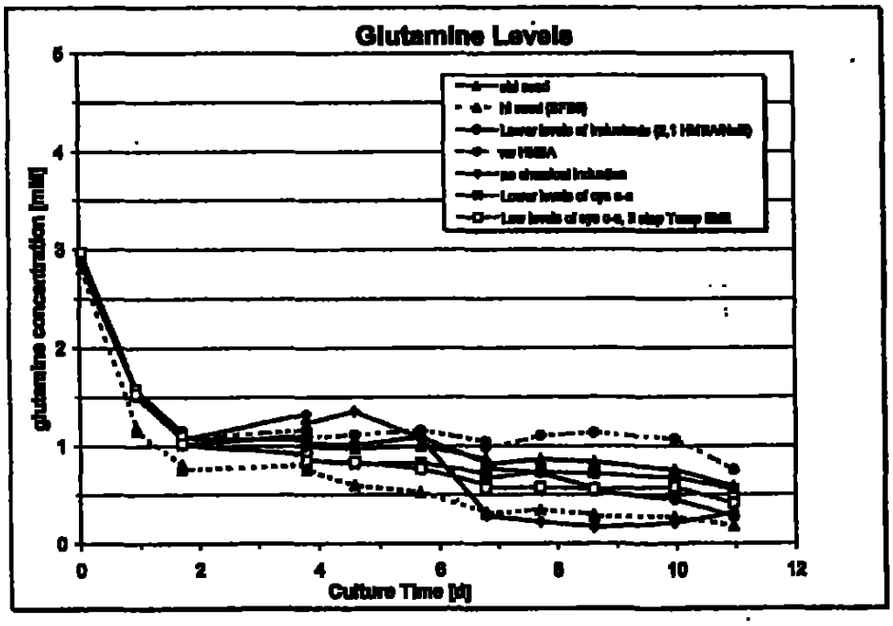


Figure 70. Lactate concentration in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

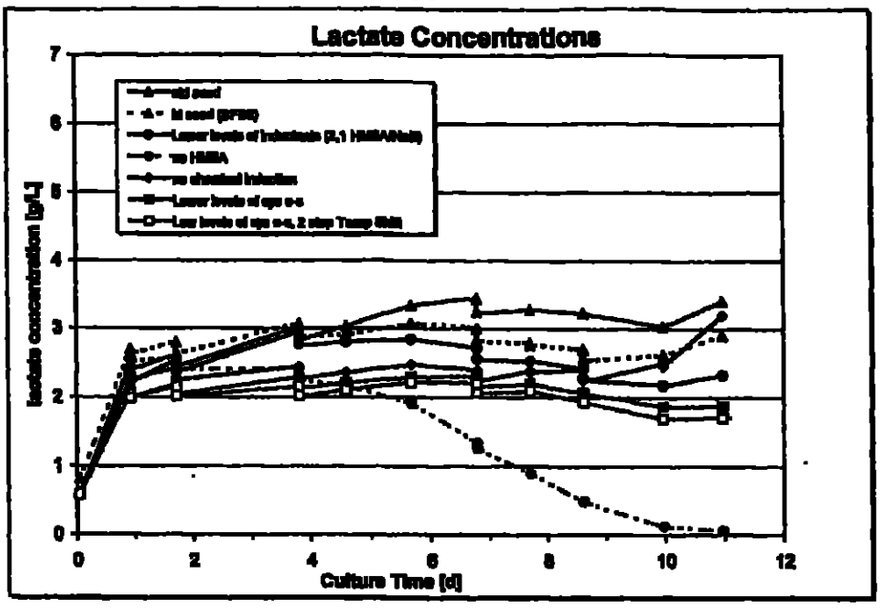


Figure 71. Ammonium levels in cultures of cells expressing TNFR-Ig under various experimental conditions.

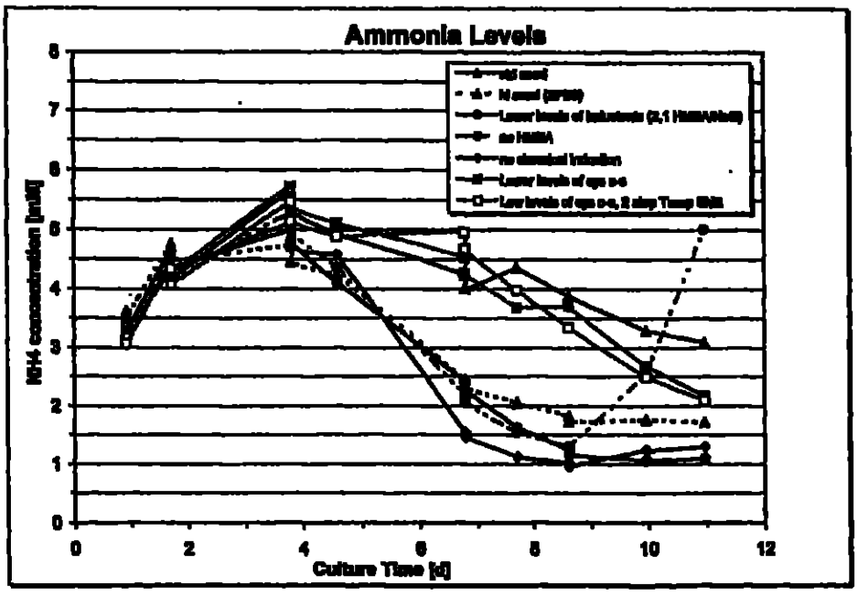


Figure 72. TNFR-Ig relative titer under various experimental conditions.

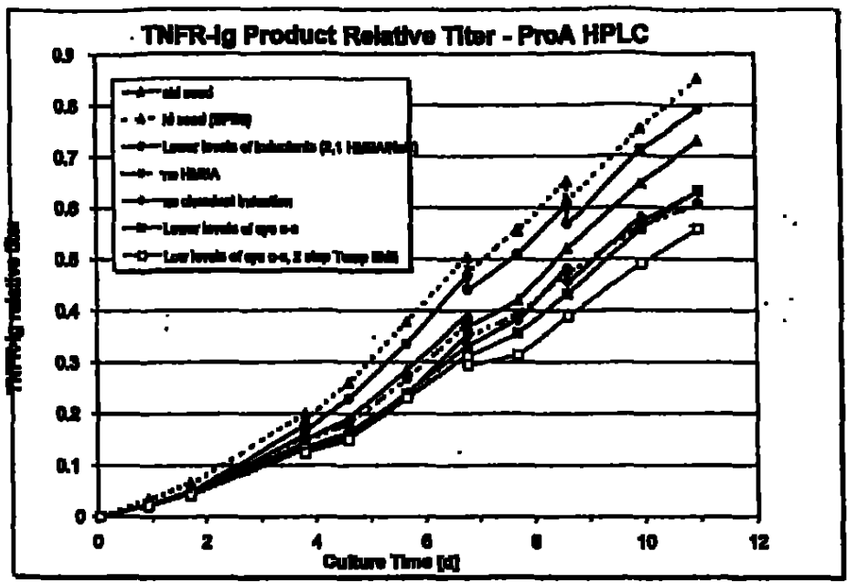


Figure 73. Cell Densities of Anti-GDF-8 Cells Grown in 6000 L and 1 L Bioreactors.

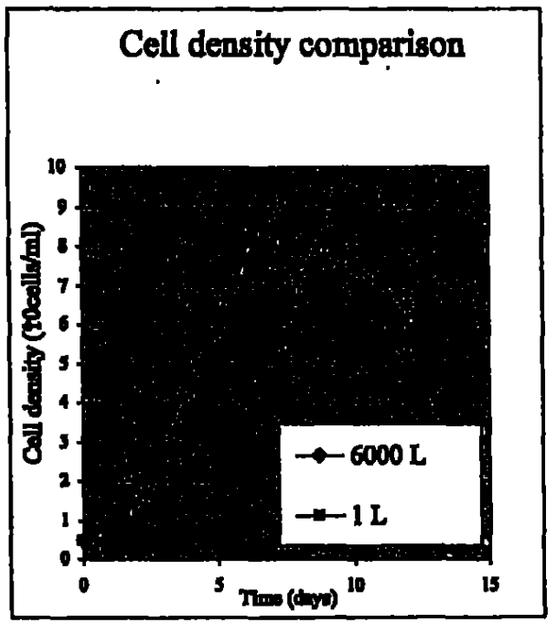


Figure 74. Titers of Anti-GDF-8 Cells Grown in 6000 L and 1 L Bioreactors.

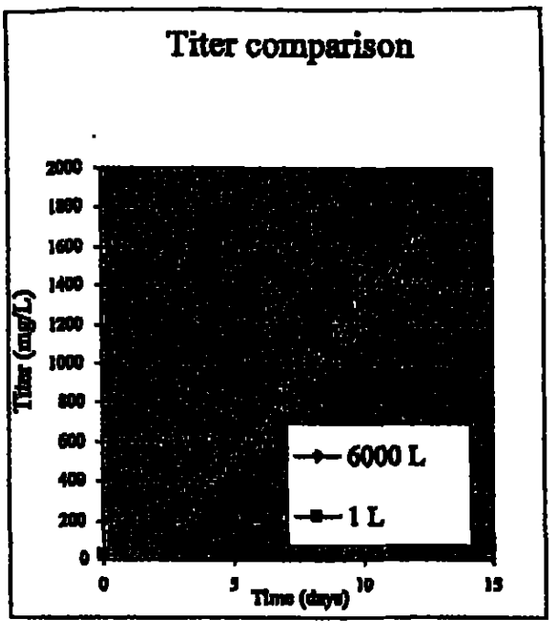


Figure 75. Lactate Levels of Anti-GDF-8 Cells Grown in 6000 L and 1 L Bioreactors.

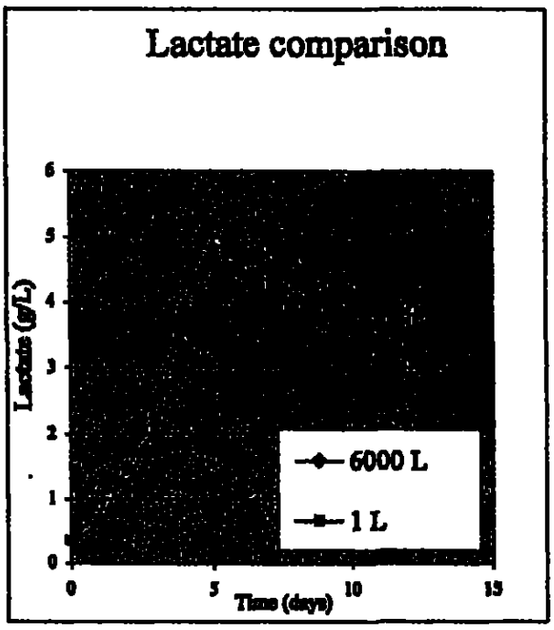
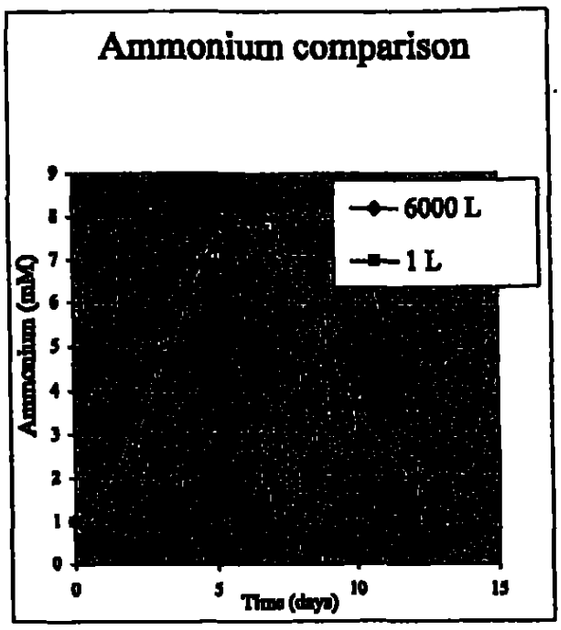


Figure 76. Ammonium Levels of Anti-GDF-8 Cells Grown in 6000 L and 1 L Bioreactors.

147


Ammonium comparison
Ammonium (mM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
5
10
15
Time (days)
6000 L
1 L

PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS

Antecedentes de la invención

[0001] Las proteínas y los polipéptidos han cobrado creciente importancia como agentes terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas y los polipéptidos terapéuticos se producen en cultivo celular, a partir de células diseñadas o seleccionadas para producir niveles inusualmente altos de la proteína o del polipéptido particular de interés. El control y la optimización de las condiciones de cultivo celular son decisivamente importantes para la producción comercial exitosa de proteínas y polipéptidos.

[0002] Muchas proteínas y polipéptidos producidos en cultivo celular se elaboran en un proceso de lote, o de alimentación de lote, donde las células se cultivan durante un período, luego se finaliza el cultivo, y se aísla la proteína o el polipéptido producido. La cantidad y calidad finales de proteína o polipéptido producido pueden ser afectadas drásticamente por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos tradicionales de cultivo de lote y de alimentación de lote a menudo obtienen productos de desecho metabólicos que poseen efectos nocivos sobre el crecimiento y la viabilidad de las células, y sobre la producción o estabilidad de la proteína o el polipéptido de interés. Si bien se han hecho esfuerzos por mejorar la producción de proteínas y polipéptidos en procesos de cultivo de lote y de alimentación de lote, continúa la necesidad de perfeccionamientos adicionales.

[0003] Además, se han invertido significativos esfuerzos en el desarrollo de medios definidos (esto es, medios reunidos a partir de componentes individuales conocidos, y que carecen de suero u otros subproductos de animales) para el uso en el cultivo de células, en particular, células de mamíferos. Las características del crecimiento celular pueden ser muy diferentes en medios definidos, en contraste con medios derivados de suero.

Se observa una necesidad particular de formulación de mejores sistemas para la producción de proteínas y polipéptidos mediante el cultivo de células en medios definidos.

Sumario de la invención

[0004] La presente invención proporciona un sistema mejorado para la producción a gran escala de proteínas y polipéptidos en cultivo de células. Por ejemplo, la presente invención provee métodos de cultivo de escala comercial (por ejemplo, 500 litros o más) que utilizan un medio caracterizado por una o más de las siguientes características: 1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; o 5) una cantidad acumulada combinada de concentración de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM. El experto en el arte comprenderá que el término "acumulado/a", como se emplea anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente particular o de componentes particulares agregados en el transcurso del cultivo celular, entre ellos, componentes agregados al comienzo del cultivo y componentes agregados posteriormente. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, es conveniente minimizar las "alimentaciones" del cultivo con el transcurso del tiempo, de manera que sea conveniente maximizar las cantidades presentes al comienzo. Naturalmente, los componentes del medio son metabolizados durante el cultivo, de manera que los cultivos con las mismas cantidades acumuladas de componentes determinados tendrán diferentes niveles absolutos si dichos componentes se agregan en momentos distintos

(por ejemplo, el caso donde todos están inicialmente presentes, en comparación con el caso donde se agregan algunos con las alimentaciones).

[0005] De acuerdo con la presente invención, el uso de dicho medio permite altos niveles de producción de proteína, y disminuye la acumulación de ciertos factores indeseables, tales como amonio o lactato.

[0006] El experto en el arte entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención abarcan tanto medios definidos como no definidos. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el medio de cultivo es un medio definido, donde la composición del medio es conocida y controlada.

[0007] En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, los métodos de cultivo comprenden el cambio del cultivo, de un primer conjunto de condiciones de cultivo, a un segundo conjunto de condiciones de cultivo, de manera de lograr un cambio metabólico de las células. En algunas realizaciones, este cambio se realiza cuando el cultivo ha alcanzado aproximadamente 20%-80% de su densidad celular máxima. En algunas realizaciones, el cambio supone el cambio de la temperatura (o rango de temperatura) a la cual se mantiene el cultivo. Alternativa o adicionalmente, la presente invención provee métodos ajustados de manera que, después de alcanzar un pico, los niveles de lactato o amonio en el cultivo disminuyen con el tiempo. En otras realizaciones, el cambio supone el cambio del pH, de la osmolaridad o el nivel de inductores químicos, tales como ácidos alcanoicos o sus sales.

[0008] Los cultivos de células de la presente invención pueden, opcionalmente, estar suplementados con nutrientes u otros componentes para medios, entre ellos, hormonas u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), reguladores, vitaminas, nucleósidos

o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos, tales como hexametilen-bis(acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales pueden agregarse al comienzo del cultivo, o pueden agregarse en un punto posterior, a fin de reponer nutrientes agotados, o por alguna otra razón. En general, es conveniente seleccionar la composición de medio inicial a fin de minimizar la suplementación de acuerdo con la presente invención.

[0009] De conformidad con la presente invención, pueden controlarse varias condiciones de cultivo, entre ellas, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, los niveles de lactato, los niveles de amonio, la osmolaridad o la valoración de la proteína o del polipéptido expresado.

Breve descripción de los dibujos

[0010] La Figura 1 muestra una comparación del Medio 1 y el Medio 2 en frascos de agitación, usando células anti-GDF-8.

[0011] La Figura 2 muestra el crecimiento celular y la viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 1.

[0012] La Figura 3 muestra el crecimiento celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control.

[0013] La Figura 4 muestra la viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control.

[0014] La Figura 5 muestra los niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control.

[0015] La Figura 6 muestra los niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control.

[0016] La Figura 7 muestra la valoración anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control.

[0017] La Figura 8 muestra la densidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de alimentación careciente de glutamina y de control.

[0018] La Figura 9 muestra la viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de alimentación careciente de glutamina y de control.

[0019] La Figura 10 muestra los niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo careciente de glutamina y de control.

[0020] La Figura 11 muestra los niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo careciente de glutamina y de control.

[0021] La Figura 12 muestra la valoración anti-GDF-8 en condiciones de cultivo carecientes de glutamina y de control.

[0022] La Figura 13 muestra la respuesta de dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2.

[0023] La Figura 14 muestra la densidad celular de cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0024] La Figura 15 muestra la viabilidad celular de cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0025] La Figura 16 muestra la valoración anti-Lewis Y en cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0026] La Figura 17 muestra los niveles de lactato en cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0027] La Figura 18 muestra los niveles de amonio en cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0028] La Figura 19 muestra la osmolaridad de cultivos de alimentación de glutamato y glutamina.

[0029] La Figura 20 muestra la densidad celular de células anti-Lewis Y. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones.

[0030] La Figura 21 muestra la viabilidad celular de células anti-Lewis Y. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones.

[0031] La Figura 22 muestra la valoración promedio de cultivo anti-Lewis Y. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones.

[0032] La Figura 23 muestra los niveles de amonio de células anti-Lewis Y. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones.

[0033] La Figura 24 muestra un impulsor de salto utilizado en cultivos de alimentación de lote.

[0034] La Figura 25 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0035] La Figura 26 muestra la viabilidad de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0036] La Figura 27 muestra la valoración anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0037] La Figura 28 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0038] La Figura 29 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0039] La Figura 30 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0040] La Figura 31 muestra la valoración anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0041] La Figura 32 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0042] La Figura 33 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales.

[0043] La Figura 34 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0044] La Figura 35 muestra la viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0045] La Figura 36 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0046] La Figura 37 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0047] La Figura 38 muestra los niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0048] La Figura 39 muestra la valoración anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0049] La Figura 40 muestra la osmolaridad de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina.

[0050] La Figura 41 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0051] La Figura 42 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0052] La Figura 43 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0053] La Figura 44 muestra los niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0054] La Figura 45 muestra los niveles de glutamato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0055] La Figura 46 muestra la valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0056] La Figura 47 muestra la osmolaridad de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína.

[0057] La Figura 48 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas.

[0058] La Figura 49 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas.

[0059] La Figura 50 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas.

[0060] La Figura 51 muestra los niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas.

[0061] La Figura 52 muestra la valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas.

[0062] La Figura 53 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

[0063] La Figura 54 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

[0064] La Figura 55 muestra los niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

[0065] La Figura 56 muestra la valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

[0066] La Figura 57 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en los Medios 1; 3 y 9.

[0067] La Figura 58 muestra la valoración anti-GDF-8 en los Medios 1; 3 y 9.

[0068] La Figura 59 muestra las valoraciones anti-GDF-8 extrapoladas para varios niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina combinadas totales.

[0069] La Figura 60 muestra el crecimiento celular de células anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0070] La Figura 61 muestra la viabilidad celular de células anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0071] La Figura 62 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0072] La Figura 63 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0073] La Figura 64 muestra la valoración de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0074] La Figura 65 muestra la osmolaridad de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas.

[0075] La Figura 66 muestra el crecimiento celular de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0076] La Figura 67 muestra la viabilidad de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0077] La Figura 68 muestra glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0078] La Figura 69 muestra los niveles de glutamina en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0079] La Figura 70 muestra la concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0080] La Figura 71 muestra los niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0081] La Figura 72 muestra la valoración relativa de TNFR-Ig en varias condiciones experimentales.

[0082] La Figura 73 muestra las densidades celulares de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l.

[0083] La Figura 74 muestra las valoraciones de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l.

[0084] La Figura 75 muestra los niveles de lactato de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l.

[0085] La Figura 76 muestra los niveles de amonio de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l.

Definiciones

[0086] "Aproximadamente", "alrededor de": conforme a esta solicitud, los términos "aproximadamente" y "alrededor de", aplicados a una o más condiciones de cultivo celular particulares, se refieren a un rango de valores similares al valor de referencia establecido para esa condición de cultivo o condiciones de cultivo. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" se refiere a un rango de valores dentro del 25; 20; 19; 18; 17; 16; 15; 14; 13; 12; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 por ciento o menos del valor de referencia establecido para esa condición de cultivo o condiciones de cultivo.

[0087] "Aminoácido": el término "aminoácido", conforme a esta solicitud, se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos

naturales utilizados normalmente en la formación de polipéptidos, o análogos o derivados de dichos aminoácidos. Los aminoácidos de la presente invención se proveen en medio para cultivos celulares. Los aminoácidos proporcionados en el medio pueden proveerse como sales, o en forma de hidratos.

[0088] "Anticuerpo": el término "anticuerpo" conforme a esta solicitud se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento Fab o $F(ab')_2$, que contiene uno o más sitios de unión de antígeno que se unen de manera específica a un antígeno (inmunorreaccionan con un antígeno). Los términos "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpo monoclonal", según se utilizan en esta solicitud, se refieren a una población clonal de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítope particular de un antígeno, mientras que los términos "anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpo policlonal" se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión de antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. La definición de anticuerpos monoclonales incluye tanto moléculas clonales derivadas por tecnologías tradicionales, como moléculas de secuencia definida derivadas por manipulación o mutación de residuos específicos, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

[0089] "Cultivo de lote": el término "cultivo de lote", como se emplea en esta solicitud, se refiere a un método de cultivo de células, donde todos los componentes que en última instancia se usarán en el cultivo de las células, entre ellos, el medio (ver definición de "medio" a continuación), como así también, las células en sí mismas, se proveen al comienzo del proceso de cultivo. Un cultivo de lote habitualmente se detiene

en algún punto, y se cosechan las células o componentes en el medio, y en forma opcional, se purifican.

[0090] "Biorreactor": el término "biorreactor", conforme a esta solicitud, se refiere a cualquier recipiente utilizado para el crecimiento de un cultivo de células de mamíferos. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño, siempre que sea útil para el cultivo de células de mamíferos. En general, el biorreactor será de por lo menos 1 litro, y puede ser de 10; 100; 250; 500; 1000; 2500; 5000; 8000; 10.000; 12.0000 (N. de T.: como aparece en el original) litros o más, o de cualquier volumen comprendido entre estos valores. Las condiciones internas del biorreactor, entre ellas, sin limitación, el pH y la temperatura, en general se controlan durante el período de cultivo. El biorreactor puede estar hecho de cualquier material adecuado para mantener cultivos de células de mamíferos suspendidas en medio, en las condiciones de cultivo de la presente invención, por ejemplo, vidrio, plástico o metal. El término "biorreactor de producción", conforme a esta solicitud, se refiere al biorreactor final empleado en la producción del polipéptido o de la proteína de interés. El volumen del biorreactor de producción de cultivo de células de gran escala en general es por lo menos 500 litros, y puede ser de 1000; 2500; 5000; 8000; 10.000; 12.0000 (N. de T.: como aparece en el original) litros o más, o cualquier volumen comprendido entre estos valores. El experto en el arte tendrá conocimiento de los biorreactores adecuados para el uso en la práctica de la presente invención, y podrá seleccionarlos consecuentemente.

[0091] "Densidad celular": el término "densidad celular", conforme a esta solicitud, se refiere a aquel número de células presentes en un volumen determinado de medio.

[0092] "Viabilidad celular": el término "viabilidad celular", conforme a esta solicitud, se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir en un grupo determinado de

condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término, según se emplea en esta solicitud, también se refiere a aquella porción de células que están vivas en un momento particular, en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

[0093] "Cultivo", "cultivo celular" y "cultivo de células de mamífero": estos términos, conforme a esta solicitud, se refieren a una población de células de mamíferos que está suspendida en un medio (ver definición de "medio" más adelante), en condiciones adecuadas para la supervivencia o el crecimiento de la población de células. Como será evidente para el experto en el arte, estos términos, como se usan en esta solicitud, pueden referirse a la combinación que comprende la población de células de mamíferos y el medio en el cual se suspende la población.

[0094] "Cultivo de alimentación de lote": el término "cultivo de alimentación de lote", conforme a esta solicitud, se refiere a un método de cultivo de células, donde se proveen componentes adicionales al cultivo en algún momento posterior al comienzo del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados en general comprenden suplementos nutricionales para las células, que se han agotado durante el proceso de cultivo. Un cultivo de alimentación de lote en general se detiene en algún momento, y se cosechan las células o componentes en el medio, y en forma opcional, se purifican.

[0095] "Fragmento": el término "fragmento", conforme a esta solicitud, se refiere a polipéptidos, y se define como cualquier porción separada de un polipéptido determinado, que es único, o característico de ese polipéptido. El término según se utiliza en esta solicitud también se refiere a cualquier porción separada de un polipéptido determinado, que retiene por lo menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. Preferentemente, la fracción de actividad retenida es por lo menos 10% de la actividad del polipéptido de longitud

completa. Más preferentemente, la fracción de actividad retenida es por lo menos 20%; 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 80% o 90% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Aun más preferentemente, la fracción de actividad retenida es por lo menos 95%, 96%; 97%; 98%; o 99% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Con mayor preferencia, la fracción de actividad retenida es 100% de la actividad del polipéptido de longitud completa. El término, como es utilizado como en esta solicitud, también se refiere a cualquier porción de un polipéptido determinado, que incluye por lo menos un elemento de secuencia establecido hallado en el polipéptido de longitud completa. Preferentemente, el elemento de secuencia abarca por lo menos 4-5, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

[0096] "Gen": el término "gen", conforme a esta solicitud, se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, ADN o ARN, donde por lo menos una porción codifica un producto final separado, en general, sin limitación, un polipéptido, que funciona en algún aspecto del metabolismo o del desarrollo celular. El término no tiene la intención de referirse solo a la secuencia codificadora que codifica el polipéptido u otro producto final separado, sino que también puede abarcar regiones que preceden y que siguen a la secuencia codificadora, que modulan el nivel basal de expresión (ver definición de "elemento de control genético", más adelante), como así también, secuencias intervinientes ("intrones") entre los segmentos de codificación individuales ("exones").

[0097] "Elemento de control genético": el término "elemento de control genético", como se emplea en esta solicitud, se refiere a cualquier elemento de secuencia que module la expresión de un gen, al cual está funcionalmente ligado. Los elementos de control genético pueden funcionar aumentando o

disminuyendo los niveles de expresión, y pueden ubicarse antes de la secuencia codificadora, después de la secuencia codificadora, o dentro de la secuencia codificadora. Los elementos de control genético pueden actuar en cualquier etapa de la expresión de genes, regulando, por ejemplo, la iniciación, la elongación o la terminación de la transcripción, el empalme de ARNm, la edición de ARNm, la estabilidad de ARNm, la localización de ARNm dentro de la célula, la iniciación, elongación o terminación de la traducción; o cualquier otra etapa de la expresión de genes. Los elementos de control genético pueden funcionar individualmente o en combinación entre sí.

[0098] "Hibridoma": el término "hibridoma", de conformidad con esta solicitud, se refiere a una célula creada por fusión de una célula inmortalizada derivada de una fuente inmunológica y una célula productora de anticuerpo. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales utilizadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente de mamífero, por ejemplo, sin limitación, de rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y seres humanos. El término además abarca líneas de células de trioma, que resultan cuando la progenie de fusiones de mielomas heterohíbridos, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea de células de mieloma de murino, posteriormente se fusionan con una célula de plasma. Además, el término tiene la intención de incluir cualquier línea de células híbridas inmortalizadas que produzca anticuerpos, tales como cuadromas (ver, por ejemplo, Milstein y col., *Nature*, 537: 3053 (1983)).

[0099] "Densidad celular viable integrada": el término "densidad celular viable integrada", conforme a esta solicitud, se refiere a la densidad promedio de células viables en el transcurso del cultivo, multiplicada por la cantidad de tiempo que ha llevado el cultivo. Dando por hecho que la cantidad de

polipéptido o proteína producidos es proporcional al número de células viables presentes en el transcurso del cultivo, la densidad celular viable integrada es una herramienta útil para calcular la cantidad de polipéptido o proteína producidos en el transcurso del cultivo.

[00100] "Medio", "medio de cultivo celular", "medio de cultivo": estos términos, conforme a lo utilizado en esta solicitud, se refieren a una solución que contiene nutrientes que alimentan las células de mamífero en crecimiento. En general, estas soluciones proveen aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos necesarios para el mínimo crecimiento y supervivencia de la célula. La solución además puede contener componentes que mejoran el crecimiento o la supervivencia a niveles superiores a la tasa mínima, por ejemplo, hormonas y factores de crecimiento. La solución preferentemente se formula a un pH y en una concentración salina óptimos para la supervivencia y la proliferación celulares. El medio también puede ser un "medio definido" -un medio libre de suero, que no contiene proteínas, hidrolizados ni componentes de composición desconocida. Los medios definidos están libres de componentes derivados de animales, y todos los componentes tienen una estructura química conocida.

[00101] "Producto de desecho metabólico": el término "producto de desecho metabólico", conforme a esta solicitud, se refiere a compuestos producidos por el cultivo celular como resultado de procesos metabólicos normales o anormales, que, en cierta forma, son nocivos para el cultivo celular, en particular, en relación con la expresión o actividad de una proteína o polipéptido biotecnológico deseado. Por ejemplo, los productos de desecho metabólico pueden ser nocivos para el crecimiento o la viabilidad del cultivo celular; pueden disminuir la cantidad de proteína o polipéptido biotecnológico producido; pueden alterar el pliegue,

la estabilidad, la glicosilación u otra modificación postraducción del polipéptido o proteína expresada, o pueden ser nocivos para las células o para la expresión o actividad del polipéptido o proteína biotecnológica, en cualquier cantidad de otras maneras. Ejemplos de productos de desecho metabólico son lactato, que es producido como consecuencia del metabolismo de la glucosa, y amonio, que es producido como consecuencia del metabolismo de glutamato. Un objetivo de la presente invención es disminuir la producción de productos de desecho metabólico, reducir o aun eliminar los productos de desecho metabólico en cultivos celulares de mamíferos.

[00102] "Osmolaridad" y "osmolalidad": "osmolalidad" es una medida de la presión osmótica de partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (esto es, osmoles) disueltas en 1 kg de solución (1 mOsm/kg de H_2O a 38°C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm Hg). "Osmolaridad", en contraste, se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Conforme a esta solicitud, la abreviatura "mOsm" significa "miliosmoles/kg de solución".

[00103] "Cultivo de perfusión": el término "cultivo de perfusión", conforme a esta solicitud, se refiere a un método de cultivo de células, donde se proveen al cultivo componentes adicionales en forma continua o semicontinua, luego del comienzo del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados en general son suplementos nutricionales para las células, que se han agotado durante el proceso de cultivo. En general, se cosecha una porción de las células o los componentes en el medio, sobre una base continua o semicontinua, y en forma opcional, se purifican.

[00104] "Polipéptido": el término "polipéptido", como se usa en esta solicitud, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos

ligados por medio de enlaces peptídicos. El término se usa para hacer referencia a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, si bien, una persona experta en el arte entenderá que el término no se limita a cadenas largas, y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos ligados por medio de un enlace peptídico.

[00105] "Proteína": el término "proteína", conforme a esta solicitud, se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad separada. Si un solo polipéptido es la unidad de funcionamiento separada, y necesita permanente asociación física con otros polipéptidos a fin de formar la unidad de fusionamiento separada, los términos "polipéptido" y "proteína" en esta solicitud se usan de manera indistinta. Si la unidad funcional separada está compuesta de más de un polipéptido que se asocian físicamente entre sí, el término "proteína" como se usa en esta solicitud se refiere a los múltiples polipéptidos físicamente acoplados y que funcionan juntos como la unidad separada.

[00106] "Polipéptido expresado biotecnológicamente" y "polipéptido biotecnológico": estos términos se usan en esta solicitud para hacer referencia a un polipéptido expresado desde una célula huésped de mamífero que ha sido genéticamente diseñada para expresar ese polipéptido. El polipéptido biotecnológicamente expresado puede ser idéntico o similar a los polipéptidos normalmente expresados en la célula huésped de mamífero. El polipéptido expresado biotecnológicamente también puede ser extraño a la célula huésped, esto es, heterólogo con respecto a péptidos normalmente expresados en la célula huésped de mamífero. Alternativamente, el polipéptido expresado biotecnológicamente puede ser quimérico, en términos de que porciones del polipéptido contienen secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a polipéptidos expresados normalmente en la célula huésped de mamífero, mientras que otras porciones son extrañas a la célula huésped.

[00107] "Siembra": el término "siembra", como se emplea en esta solicitud, se refiere al proceso de proveer un cultivo de células a un biorreactor u otro recipiente. Las células pueden haber sido propagadas previamente en otro biorreactor o recipiente. De manera alternativa, las células pueden haber sido congeladas y descongeladas inmediatamente antes de proveerlas al biorreactor o recipiente. El término se refiere a cualquier número de células, incluso, a una sola célula.

[00108] "Valoración": el término "valoración", como se emplea en la presente solicitud, se refiere a la cantidad total de proteína o polipéptido expresado biotecnológicamente producido por un cultivo de células de mamífero, dividido por una cantidad determinada de volumen de medio. La valoración en general se expresa en unidades de miligramos de polipéptido o proteína por mililitro de medio.

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

[00109] La presente invención provee sistemas mejorados para la producción de proteínas y polipéptidos por cultivo celular. En particular, la invención provee sistemas que minimizan la producción de uno o más productos metabólicos nocivos para el crecimiento y la viabilidad celulares, y para la producción o calidad de la proteína. En una realización preferida de la presente invención, el cultivo celular es un cultivo de lote o de alimentación de lote. Otras ciertas realizaciones preferidas de la invención se analizan en detalle a continuación. Sin embargo, el experto en el arte entenderá que varias modificaciones a estas realizaciones preferidas se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las reivindicaciones y sus equivalentes definen el alcance de la presente invención, que no está limitado por esta descripción de ciertas realizaciones preferidas, ni debe interpretarse limitado de tal forma.

Polipéptidos

[00110] De acuerdo con la presente invención, se puede producir cualquier polipéptido que sea expresable en una célula huésped. El polipéptido se puede expresar desde un gen endógeno a la célula huésped, o desde un gen introducido en la célula huésped a través de ingeniería genética. El polipéptido puede ser uno natural, o alternativamente, puede tener una secuencia diseñada o seleccionada por la mano del hombre. Un polipéptido diseñado se puede ensamblar a partir de otros segmentos de polipéptidos que aparecen en forma individual en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos no naturales.

[00111] Los polipéptidos que pueden expresarse convenientemente de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán sobre la base de una actividad biológica o química de interés. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear a fin de expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor de regulación, antígeno, agente de unión, etc., de importancia farmacéutica o comercial.

Anticuerpos

[00112] Dada la gran cantidad de anticuerpos utilizados en la actualidad, o en investigación, como agentes farmacéuticos u otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos es de particular interés de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad para unirse de manera específica a un antígeno particular. De conformidad con la presente invención, se puede emplear cualquier anticuerpo que pueda ser expresado en una célula huésped. En una realización preferida, el anticuerpo por expresar es un anticuerpo monoclonal.

[00113] En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos derivados de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión de antígeno de un anticuerpo de ratón, rata u

otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descripto una variedad de enfoques para la elaboración de anticuerpos quiméricos. Ver, por ejemplo, Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81, 6851 (1985); Takeda y col., *Nature*, 314; 452 (1985); Cabilly y col., Patente de los Estados Unidos Nro. 4 816 567; Boss y col., Patente de los Estados Unidos Nro. 4 816 397; Tanaguchi y col., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.

[00114] En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano derivado, por ejemplo, a través del uso de bibliotecas de exhibición de fagos o de exhibición de ribosomas (ver, por ejemplo, Winter y col., Patente de los Estados Unidos Nro. 6 291 159; y Kawasaki, Patente de los Estados Unidos Nro. 5 658 754), o el uso de especies xenógrafas en las cuales los genes de anticuerpos naturales son inactivados y funcionalmente reemplazados con genes de anticuerpos humanos, mientras que se dejan intactos los otros componentes del sistema inmunitario natural (ver, por ejemplo, Kucherlapati y col., Patente de los Estados Unidos Nro. 6 657 103).

[00115] En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico donde la gran mayoría de los residuos de aminoácidos son derivados de anticuerpos humanos, para de ese modo minimizar cualquier reacción inmunitaria potencial cuando se administran a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos en las regiones de determinación de complementaridad son reemplazados, por lo menos en parte, por residuos de una especie no humana que confiere una afinidad o especificidad de antígeno deseada. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden elaborarse mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en el arte (por ejemplo, Teng y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 7308-7312 (1983);

Kozbor y col., *Immunology Today*, 4, 7279 (1983); Olsson y col., *Meth. Enzymol.*, 92, 3-16 (1982)), y preferentemente se elaboran de acuerdo con las enseñanzas de la Publicación PCT WO 92/06193, o EP 0239400, incorporadas a la presente solicitud a modo de referencia). Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos comercialmente, por ejemplo, por Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña. Para más referencias, ver Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992), incorporadas a la presente solicitud a modo de referencia.

[00116] En otra realización preferida, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descriptos con anterioridad pueden contener residuos de aminoácidos que no aparecen naturalmente en ningún anticuerpo en ninguna especie de la naturaleza. Estos residuos extraños se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir especificidad, afinidad o función efectora nuevas o modificadas, al anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado. En otra realización preferida, los anticuerpos que se describen con anterioridad pueden ser conjugados con fármacos para farmacoterapia sistémica, por ejemplo, con toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica y radionúclidos (por ejemplo, ver Kunz y col., *Calicheamicin derivative-carrier conjugates*, US 20040082764 A1).

[00117] En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo que se une de manera específica al fragmento Aβ de la proteína precursora amiloide, o a otros componentes de una placa amiloide, y es útil para combatir la acumulación de placas amiloides en el cerebro, hecho que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer (ver, por ejemplo, Solicitud Provisional de los Estados Unidos 60/636.684).

[00118] En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se dirigen contra antígenos de superficie celular

expresados en células o tejidos blanco en trastornos proliferativos, tales como cáncer. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-Lewis Y IgG1. Lewis Y es un antígeno de carbohidrato con la estructura Fucą1 → 2Galβ1 → 4[Fucą1 → 3]GlcNacβ1 → 3R (Abe y col., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 11793-11797). El antígeno Lewis Y es expresado en la superficie del 60% a 90% de los tumores epiteliales humanos (entre ellos, los de mama, colon, pulmón y próstata), por lo menos 40% de los cuales sobreexpresan este antígeno, y tiene expresión limitada en tejidos normales.

[00119] A fin de apuntar Ley y apuntar a un tumor de manera eficaz, se necesita de manera ideal un anticuerpo con especificidad exclusiva para el antígeno. Por lo tanto, preferentemente, los anticuerpos anti-Lewis Y de la presente invención no reaccionan en forma cruzada con las estructuras de tipo I (esto es, la serie lacto de grupos sanguíneos (Lea y Leb)), y preferentemente, no se unen a otros epítopes tipo 2 (esto es, estructura neolacto), como estructuras Lex y H-tipo 2. Un ejemplo de un anticuerpo anti-Lewis Y preferido se designa hu3S193 (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 6 310 185; 6 518 415; 5 874 060; incorporadas a la presente solicitud en su totalidad). El anticuerpo humanizado hu3S193 (Attia, M. A. y col., 1787-1800) se generó por injerto de CDF de 3S193, que es un anticuerpo monoclonal de murino producido contra célula de adenocarcinoma con especificidad excepcional para Ley (Kitamura, K., 12957-12961). Hu3S193 no solo retiene la especificidad de 3S193 para Ley, sino que, además, ha ganado en la capacidad para mediar la citotoxicidad dependiente de complemento (de aquí en adelante referida como CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (de aquí en adelante referida como ADCC) (Attia, M. A. y col., 1787-1800). Este anticuerpo apunta xenoinjertos que expresan Ley en ratones lampiños, como lo demuestran los estudios

de biodistribución con hu3S193 marcado con 125I, 111In o 18F, como así también, otras radiomarcas que requieren un agente quelante, tal como 111In, 99mTc o 90Y (Clark y col., 4804-4811).

[00120] En otra realización, el anticuerpo es uno de los anticuerpos anti-GDF-8 humanos denominados Myo29, Myo28 y Myo22, y anticuerpos y fragmentos de unión de antígeno derivados de ellos. Estos anticuerpos pueden unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad, inhibir la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo*, como se demuestra, por ejemplo, por la inhibición de unión de ActRIIB y ensayos de genes reporteros, y pueden inhibir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de la masa de músculo esquelético y la densidad ósea. Ver, por ejemplo, Veldman y col., Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 2004 0142382.

Receptores

[00121] Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos o comerciales incluye receptores. Los receptores en general son glucoproteínas de transmembrana que funcionan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Habitualmente, los receptores tienen un dominio de quinasa de proteína, además del dominio de reconocimiento de ligando, que inicia una vía de señalización mediante la fosforilación de moléculas intracelulares blanco al unirse al ligando, lo que conduce a cambios metabólicos o de desarrollo dentro de la célula. En una realización, los receptores de interés son modificados de manera de eliminar el dominio de transmembrana o intracelular; en su lugar, puede adjuntarse opcionalmente un dominio Ig. En una realización preferida, los receptores por producir de acuerdo con la presente invención son tirosina quinasas de receptores (RTK, por sus siglas en inglés). La familia de RTK incluye receptores cruciales para una variedad de funciones en numerosos tipos celulares (ver, por ejemplo, Yarden y Ullrich, *Ann. Rev. Biochem.*, 57: 433-478, 1988; Ullrich y Schlessinger, *Cell*, 61: 243-254, 1990,

incorporadas a la presente solicitud como referencia). Ejemplos no limitativos de RTK comprenden miembros de la familia de receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), miembros de la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF, por sus siglas en inglés), tirosina quinasa con dominios-1 de homología de EGF e inmunoglobulina (TIE-1, por sus siglas en inglés), y receptores TIE-2 (Sato y col., *Nature*, 376 (6535): 70-74 (1995), incorporada a la presente solicitud a modo de referencia) y receptor c-Met; se ha sugerido que algunos de estos promueven la angiogenia, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, *J. Cell Biol.*, 129: 895-898, 1995). Otros ejemplos, sin limitación, de RTK incluyen quinasa 1 de hígado fetal (FLK-1, por sus siglas en inglés; a veces denominada receptor que contiene dominio de inserción de quinasa (KDR, por sus siglas en inglés) (Terman y col., *Oncogene*, 6: 1677-83, 1991) o receptor 2 de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGFR-2, por sus siglas en inglés)), tirosina quinasa-1 de tipo fms (Flt-1) (DeVries y col., *Science*, 255; 989-991; 1992; Shibuya y col., *Oncogene*, 5: 519-524, 1990), a veces referida como receptor 1 de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGFR-1, por sus siglas en inglés), neuropilina-1, endoglina, endosialina y Axl. Los expertos en el arte tendrán conocimiento de otros receptores que pueden ser expresados preferentemente de acuerdo con la presente invención.

[00122] En una realización particularmente preferida, conforme a la presente invención se expresan inhibidores de factor de necrosis tumoral, en forma de receptores alfa y beta de factor de necrosis tumoral (TNFR-1; EP 417 563, publicada el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, EP 417 014, publicada el 20 de marzo de 1991) (para reseña, ver Naismith y Sprang, *J. Inflamm.*, 47 (1-2): 1-7 (1995-96), incorporada a la presente solicitud como referencia).

Conforme a una realización, el inhibidor de factor de necrosis tumoral comprende un receptor de TNF soluble, y preferentemente, un TNFR-Ig. En una realización, los inhibidores de TNF preferidos de la presente invención son formas solubles de TNFRI y NTFRII, como así también, proteínas de unión de TNF solubles; en otra realización, la fusión TNFR-Ig es un TNFR:Fc, un término que, utilizado en la presente solicitud, se refiere a "etanercept", que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor p75 TNF-.alfa, donde cada molécula consiste en una porción Fc de 235 aminoácidos de IgG.sub.1 humano.

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

[00123] Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y comerciales incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Los factores de crecimiento habitualmente son glucoproteínas secretadas por células, que se unen a receptores en otras células y los activan, para iniciar un cambio metabólico o de desarrollo en la célula receptora. En una realización, la proteína de interés es un polipéptido de fusión ActRIIB, que comprende el dominio extracelular del receptor ActRIIB y la porción Fc de un anticuerpo (ver, por ejemplo, Wolfman y col., *ActRIIB fusion polypeptides and uses therefor,* US 2004/0223966 A1). En otra realización, el factor de crecimiento puede ser un propéptido GDF-8 modificado (ver, por ejemplo, Wolfman y col., *Modified and stabilized GDF propeptides and uses thereof,* US 2003/0104406 A1). Alternativamente, la proteína de interés podría ser una proteína que contiene dominio de folistatina (ver, por ejemplo, Hill y col., *GASP1: a follistatin domain containing protein,* US 2003/0162714 A1; Hill y col., *GASP1: a follistatin domain containing protein,* US 2005/0106154 A1; Hill y col., *Follistatin domain containing proteins,* US 2003/0180306 A1).

[00124] Ejemplos, sin limitación, de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización comprenden

citoquinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), tales como aFGF y bFGF; factores de crecimiento de transformación (TGF, por sus siglas en inglés), tales como TGF-alfa y TGF-beta, por ejemplo, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 o TGF-beta 5; factor de crecimiento de tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II, por sus siglas en inglés); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); proteínas de unión de factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP, por sus siglas en inglés); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores de estimulación de colonia (CSF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (TL, por sus siglas en inglés), por ejemplo, IL-1 a IL-10; factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) alfa y beta; insulina cadena A; insulina cadena B; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagon; factores coagulantes tales como factor VIIIC, factor IX, factor tisular y factor von Willebrands; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético auricular; surfactante pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; encefalinasa; RANTES (reguladas con la activación, normalmente expresadas y secretadas por células T); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); sustancia inhibitoria de Müller; relaxina cadena A; relaxina cadena B; prorrelaxina; péptido asociado con gonadotropina de ratón; factores neurotróficos, tales como factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF, por sus siglas en inglés), neurotrofina-3; -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta. El experto en el arte tendrá

conocimiento de otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que puedan expresarse de acuerdo con la presente invención.

Receptores acoplados a proteína G

[00125] Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos o comerciales incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Los receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) son proteínas que poseen siete dominios de transmembrana. Con la unión de un ligando a un GPCR, se transduce una señal dentro de la célula, que produce un cambio en una propiedad biológica o fisiológica de la célula.

[00126] Los GPCR, junto con las proteínas G y efectores (canales y enzimas intracelulares que son modulados por proteínas G), son componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de mensajeros secundarios intracelulares a entradas extracelulares. Estos genes y productos génicos son potenciales agentes causantes de enfermedades.

[00127] Se ha demostrado que defectos específicos en el gen de rodopsina y el gen de receptor de vasopresina V2 causan varias formas de retinitis pigmentosa autosómica recesiva y autosómica dominante, y diabetes insípida nefrogénica. Estos receptores tienen importancia decisiva tanto para procesos fisiológicos del sistema nervioso central como periféricos. La superfamilia de proteínas GPCR ahora contiene más de 250 tipos de parálogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones génicas (u otros procesos), como contraposición a ortólogos, el mismo receptor de diferentes especies. La superfamilia puede descomponerse en cinco familias: Familia I: receptores tipificados por rodopsina y el receptor beta2-adrenérgico, y actualmente representada por más de 200 miembros de carácter único; Familia II: la familia recientemente caracterizada de receptores de hormona paratiroidea/calcitonina/secretina; Familia

III: la familia de receptores de glutamato metabotrópicos en mamíferos; Familia IV: la familia de receptores de cAMP, importante en la qumiotaxia y desarrollo de *D. discoideum*; y Familia V: los receptores de feromonas de apareamiento fúngico, tales como STE2.

[00128] Los GPCR incluyen receptores para aminas biogénicas, para mediadores lipídicos de la inflamación, hormonas peptídicas y mediadores de la señal sensorial. Los GPCR se activan cuando el receptor se une a su ligando extracelular. Los cambios de conformación en los GPCR, que surgen como consecuencia de la interacción de ligando-receptor, afectan la afinidad de unión de una proteína G a los dominios intracelulares de GPCR. Esto permite que GTP se una con realzada afinidad a la proteína G.

[00129] La activación de la proteína G por GTP conduce a la interacción de la proteína G, subunidad α, con adenilato ciclasa u otros generadores de moléculas de mensajero secundario. Esta interacción regula la actividad de adenilato ciclasa, y en consecuencia, la producción de una molécula de mensajero secundario, cAMP. El cAMP regula la fosforilación y la activación de otras proteínas intracelulares. Alternativamente, los niveles celulares de otras moléculas de mensajero secundario, tales como cGMP o eicosinoides, pueden ser regulados de manera ascendente o de manera descendente por la actividad de los GPCR. La proteína G, subunidad a, es desactivada por la hidrólisis del GTP por GTPasa, y las subunidades α, β y γ se reasocian. La proteína G heterotrimérica entonces se disocia de la adenilato ciclasa u otro generador de molécula de mensajero secundario. La actividad de GPCR también puede ser regulada por la fosforilación de las anillas o dominios intra- y extracelulares.

[00130] Los receptores de glutamato forman un grupo de GPCR importantes en la neurotransmisión. El glutamato es el principal neurotransmisor en el SNC, y se cree que tiene funciones relevantes en la plasticidad neuronal, en la cognición, la

memoria, el aprendizaje y en algunos trastornos neurológicos tales como epilepsia, accidente cerebrovascular y neurodegeneración (Watson, S. y S. Arkinstall (1994), *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA. pp. 130-132). Estos efectos del glutamato son mediados por dos clases distintas de receptores, denominados ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos contienen un canal catiónico intrínseco, y median acciones de excitación rápidas de glutamato. Los receptores metabotrópicos son moduladores, y aumentan la capacidad de excitación de membrana de las neuronas, inhibiendo las conductancias de potasio dependientes del calcio, e inhibiendo y potenciando la transmisión de excitación de receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos se clasifican en cinco subtipos sobre la base de la farmacología agonista y las vías de transducción de señal, y se distribuyen ampliamente en los tejidos cerebrales.

[00131] La familia de polipéptidos intestinales vasoactivos (VIP, por sus siglas en inglés) es un grupo de polipéptidos relacionados cuyas acciones también son mediadas por GPCR. Los miembros claves de esta familia son VIP en sí, secretina y factor de liberación de hormona de crecimiento (GRF, por sus siglas en inglés). VIP tiene un amplio perfil de acciones fisiológicas, entre ellas, la relajación de músculos lisos, la estimulación o inhibición de la secreción en varios tejidos, la modulación de varias actividades celulares inmunitarias, y diversas actividades de excitación e inhibición en el SNC. La secretina estimula la secreción de enzimas e iones en el páncreas y el intestino, y también se presenta en pequeñas cantidades en el cerebro. GRF es un importante agente neuroendocrino que regula la síntesis y la liberación de hormona de crecimiento desde la adenohipófisis (Watson, S. y S. Arkinstall, *supra*, pp. 278-283).

[00132] Después de la unión de ligando al GPCR, se transmite un cambio de conformación a la proteína G, lo que hace que la

subunidad α intercambie una molécula GDP unida por una molécula GTP, y se disocie de las subunidades βγ. La forma de la subunidad α unida a GTP habitualmente funciona como una porción moduladora efectora, lo que conduce a la producción de mensajeros secundarios, tales como AMP cíclico (por ejemplo, por activación de adenilato ciclasa), diacilglicerol o inositol fosfatos. En el hombre se conocen más de 20 tipos diferentes de subunidades α, que se asocian con un grupo menor de subunidades β y γ. Ejemplos de proteínas G de mamíferos incluyen Gi, Go, Gq, Gs y Gt. Las proteínas G se describen exhaustivamente en Lodish H. y col., *Molecular Cell Biology* (Scientific American Books Inc., New York, N. Y., 1995), cuyos contenidos se incorporan a la presente solicitud a modo de referencia.

[00133] Los GPCR constituyen un importante blanco para la acción y el desarrollo de fármacos. De hecho, los receptores han conducido a más de la mitad de los fármacos actualmente conocidos (Drews, *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1516), y los GPCR representan el blanco más importante para la intervención terapéutica, donde el 30% de los fármacos clínicamente prescritos o bien antagonizan o agonizan un GPCR (Milligan, G. y Rees, S. (1999), *TIPS*, 20: 118-124). Esto demuestra que estos receptores poseen antecedentes establecidos y probados como agentes terapéuticos.

[00134] En general, aquellos que pongan en práctica la presente invención seleccionarán su polipéptido de interés, y sabrán su secuencia de aminoácidos precisa. Las técnicas de la presente invención se han aplicado con éxito a la producción de diversos polipéptidos, entre ellos, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano dirigido al factor 8 de diferenciación y crecimiento (Ejemplos 1; 3; 4; 7-14); anticuerpo anti-Lewis Y humanizado (Ejemplos 5 y 6); anti-ABeta (Ejemplo 15); y una proteína de fusión Fc dímera de receptor de factor de necrosis tumoral (Ejemplo 16), lo que indica que la presente invención será útil

para la expresión de una variedad de diferentes polipéptidos y proteínas. Cualquier proteína determinada que deba expresarse de acuerdo con la presente invención tendrá sus propias características idiosincrásicas, puede afectar la densidad o la viabilidad celular de las células cultivadas, y puede expresarse en niveles inferiores en comparación con otro polipéptido o proteína cultivado en condiciones de cultivo idénticas. El experto en el arte podrá modificar apropiadamente las etapas y composiciones de la presente invención a fin de optimizar el crecimiento celular o producción de cualquier proteína o polipéptido expresado determinado.

Elementos de control genético

[00135] Como será evidente para los expertos en el arte, los elementos de control genético pueden emplearse con la finalidad de regular la expresión génica del polipéptido o proteína. Dichos elementos de control genético deben seleccionarse de manera de ser activos en la célula huésped pertinente. Los elementos de control pueden ser constitutivamente activos, o pueden ser inducibles en circunstancias definidas. Los elementos de control inducibles son particularmente útiles cuando la proteína expresada es tóxica, o de lo contrario, cuando posee efectos nocivos para el crecimiento o la viabilidad celular. En dichos casos, la regulación de la expresión del polipéptido o la proteína mediante elementos de control inducibles puede mejorar la viabilidad celular, la densidad celular o el rendimiento total de la proteína o polipéptido expresado. Se conocen en el arte una gran cantidad de elementos de control útiles en la práctica de la presente invención, que pueden obtenerse.

[00136] Los promotores de mamíferos constitutivos representativos que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, el promotor de hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR, por sus siglas en inglés), el promotor de adenosina desaminasa, el promotor de piruvato

quinasa, el promotor de beta-actina, como así también otros promotores constitutivos conocidos por los expertos en el arte. Adicionalmente, los promotores virales que han demostrado conducir la expresión constitutiva de secuencias de codificación en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores de virus de simio, promotores de virus de herpes simple, promotores de virus de papiloma, promotores de adenovirus, promotores del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), promotores de virus de sarcoma Rous, promotores de citomegalovirus (CMV), las repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) del virus de leucemia de murino Moloney y otros retrovirus, el promotor de timidina quinasa del virus de herpes simple, como así también, otros promotores virales conocidos por los expertos en el arte.

[00137] Los promotores inducibles conducen la expresión de secuencias codificadoras funcionalmente ligadas en presencia de un agente inductor, y también se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en células de mamíferos, el promotor de metalotioneína induce la transcripción de secuencias codificadoras corriente descendente en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles serán reconocidos o conocidos por los expertos en el arte.

[00138] En general, la secuencia de expresión génica también incluirá secuencias no transcripción 5' y no traducción 5' comprometidas en la iniciación de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como caja TATA, secuencia de cubierta, secuencia CAAT y similares. En forma opcional, se pueden emplear elementos mejoradores a fin de aumentar los niveles de expresión de los polipéptidos o proteínas por expresar. Ejemplos de elementos mejoradores que han demostrado funcionar en células de mamíferos abarcan el mejorador del gen anterior de SV40, como se describe en Dijkema y col., *EMBO J.* (1985), 4: 761, y el mejorador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus de sarcoma Rous (RSV), como se describe en Gorman y

col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1982b), 79: 6777 y el citomegalovirus humano, como se describe en Boshart y col., *Cell* (1985), 41: 521.

[00139] Los sistemas para ligar elementos de control a secuencias codificadoras son bien conocidos en el arte (en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, incorporado a la presente solicitud a modo de referencia, se describen técnicas de ADN biotecnológicas y biológicas moleculares generales). Los vectores comerciales adecuados para la inserción de secuencia codificadora preferida para expresión en varias células de mamíferos, en una variedad de condiciones de crecimiento e inducción, son bien conocidas en el arte.

Introducción de secuencias codificadoras y elementos de control relacionados, en células huéspedes

[00140] Los métodos adecuados para la introducción de ácidos nucleicos en células huéspedes de mamíferos, suficientes para lograr la expresión de los polipéptidos o proteínas de interés, son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Gething y col., *Nature,* 293: 620-625 (1981); Mantei y col., *Nature,* 281: 40-46 (1979); Levinson y col., EP 117 060; y EP 117 058, todos incorporados a la presente solicitud como referencia.

[00141] Para células de mamíferos, los métodos preferidos de transformación comprenden el método de precipitación de fosfato de calcio de Graham y van der Erb, *Virology,* 52: 456-457 (1978), o el Lipofectamine™ (Gibco BRL) *Method of Hawley-Nelson, Focus,* 15:73 (1193). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huéspedes de células de mamíferos han sido descriptos por Axel, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4 399 216, publicada el 16 de agosto de 1983. Para varias técnicas de transformación de células de mamíferos, ver Keown y col., *Methods in Enzymology* (1989), Keown y col., *Methods in Enzymology,* 185:

527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336: 348-352 (1988). Ejemplos representativos, sin limitación, de vectores adecuados para la expresión de polipéptidos o proteínas en células de mamíferos comprenden pCDNA1; pCD, ver Okayama y col. (1985), *Mol. Cell Biol.*, 5: 1136-1142; pMClneo Poly-A, ver Thomas y col., (1987), *Cell*, 51: 503-512; y un vector de baculovirus, tal como pAC 373, o pAC 610.

[00142] En realizaciones preferidas, el polipéptido o la proteína es transfectada de manera estable en la célula huésped. Sin embargo, el experto en el arte reconocerá que la presente invención se puede usar con células de mamíferos transfectadas de manera estable o transiente.

Células

[00143] De conformidad con la presente invención, se puede usar cualquier tipo celular o célula de mamífero susceptible de cultivo celular y de expresión de polipéptidos. Ejemplos, sin limitación, de células de mamíferos que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención comprenden la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC Nro. 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); la línea CV1 de riñón de ratón transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293, o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster cría (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de búfalo rata (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor

mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En una realización particularmente preferida, la presente invención se usa para el cultivo de líneas celulares CHO y expresión de polipéptidos y proteínas.

[00144] Adicionalmente, se puede emplear cualquier cantidad de líneas celulares de hibridoma que puedan obtenerse en el mercado, o que no estén disponibles en el mercado, que expresen polipéptidos o proteínas, de acuerdo con la presente invención. El experto en el arte apreciará que las líneas celulares de hibridoma podrían tener diferentes necesidades nutricionales, o podrían necesitar distintas condiciones de cultivo para el crecimiento óptimo y la expresión de polipéptidos o proteínas, y podrán modificar las condiciones según lo necesario.

[00145] Como se observa con anterioridad, en muchos casos, las células se seleccionarán o se diseñarán de manera de producir altos niveles de proteína o polipéptido. A menudo, las células se diseñan genéticamente para producir altos niveles de proteína, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, o mediante la introducción de elementos de control que regulan la expresión del gen (endógeno o introducido) codificador del polipéptido de interés.

[00146] Ciertos polipéptidos pueden tener efectos nocivos sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o alguna otra característica de las células, que en última instancia, limitan la producción del polipéptido o proteína de interés de alguna manera. Aun entre una población de células de un tipo particular diseñado para expresar un polipéptido específico, existe variabilidad dentro de la población celular, de manera que ciertas células individuales crecerán mejor, o producirán más polipéptido de interés. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, la línea de células es seleccionada

empíricamente por el aquel que pone en práctica la invención, para crecimiento fuerte en las condiciones particulares seleccionadas para el cultivo de las células. En realizaciones particularmente preferidas, las células individuales diseñadas para expresar un polipéptido particular se seleccionan para producción en gran escala, sobre la base del crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, la valoración del polipéptido expresado, o cualquier combinación de estos factores, o cualquier otra condición considerada importante por aquel que ponga en práctica la invención.

Fase de cultivo celular

[00147] Los procedimientos típicos para la producción de un polipéptido de interés comprenden cultivos de lote y cultivos de alimentación de lote. Los procesos de cultivo de lote tradicionalmente comprenden la inoculación de un cultivo de producción de gran escala, con un cultivo de siembra de una densidad celular particular; el cultivo o crecimiento de las células en condiciones que conducen al crecimiento y la viabilidad celulares; la cosecha del cultivo cuando las células alcanzan una densidad celular especificada; y la purificación del polipéptido expresado. Los procedimientos de cultivo de alimentación de lote comprenden una etapa adicional o etapas adicionales de suplementación del cultivo de lote con nutrientes u otros componentes que se consumen durante el crecimiento de las células. Un problema persistente y no resuelto que se presenta con los cultivos de lote y de alimentación de lote tradicionales es la producción de productos de desecho metabólico, que poseen efectos nocivos sobre el crecimiento y la viabilidad celulares y sobre la producción de polipéptidos expresados. Dos productos de desecho metabólico que tienen efectos particularmente nocivos son el lactato y el amonio, que son producidos como consecuencia del metabolismo de la glucosa y la glutamina, respectivamente. Además de la producción enzimática de amonio como consecuencia del

metabolismo de glutamina, el amonio también se acumula en los cultivos celulares, como resultado de la degradación no metabólica con el transcurso del tiempo. La presente invención proporciona un método mejorado para la producción de gran escala de polipéptidos, que minimiza los efectos nocivos del amonio y el lactato, disminuyendo y aun revertiendo la acumulación de estos productos de desecho en lo cultivos celulares. El experto en el arte reconocerá que la presente invención se puede emplear en cualquier sistema en el cual se cultiven células, entre ellos, sin limitación, sistemas de lote, de alimentación de lote y de perfusión. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, las células se cultivan en sistemas de lote o de alimentación de lote.

M dios

[00148] Las formulaciones tradicionales para medios, entre ellos, los medios que pueden obtenerse en el mercado, tales como el F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma), contienen niveles relativamente altos de glucosa y glutamina, en comparación con otros aminoácidos. Se creía que estos componentes eran necesarios en forma abundante, ya que constituyen las fuentes primarias de energía metabólica para las células. Sin embargo, el rápido consumo de estos nutrientes conduce a la acumulación de lactato y amonio, como ya se describió. Adicionalmente, los altos niveles iniciales de glucosa y glutamina y la posterior acumulación de lactato y amonio producen alta osmolaridad, una condición que, por sí misma, a menudo es nociva para el crecimiento celular, la viabilidad celular y la producción de polipéptidos.

[00149] La presente invención proporciona una variedad de formulaciones de medios que, cuando se emplean de conformidad con otras etapas de cultivo descriptas en esta solicitud, minimizan y aun revierten la acumulación de lactato y amonio. Las

formulaciones de medios de la presente invención que han demostrado tener efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la viabilidad celulares, o sobre la expresión de polipéptido o proteína, tienen una o más de las siguientes características: 1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM. El experto en el arte comprenderá que el término "acumulado/a", como se emplea anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente particular o de componentes particulares agregados en el transcurso del cultivo celular, entre ellos, componentes agregados al comienzo del cultivo y componentes agregados posteriormente. El experto en el arte entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención abarcan tanto medios definidos como no definidos.

[00150] Las formulaciones de medios tradicionales comienzan con un nivel relativamente bajo de aminoácidos totales, en comparación con las formulaciones de medios de la presente invención. Por ejemplo, el medio de cultivo celular tradicional conocido como DME-F12 (una mezcla 50:50 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham) tiene un contenido de aminoácidos totales de 7,29 mM, y el medio de cultivo celular tradicional conocido como RPMI-1640 tiene un contenido de aminoácidos totales de 6,44 mM (ver, por ejemplo, H. J. Morton, *In Vitro*, 6: 89-108 (1970); R. G. Ham, *Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA)*, 53: 288-293 (1965); G. E. Moore y col., *J. Am. Medical Assn.*, 199: 519-24 (1967), todos incorporados como referencia). En ciertas realizaciones de la presente invención, la

concentración de aminoácidos en el medio de cultivo preferentemente es superior a alrededor de 70 mM. Aun con mayor preferencia, las formulaciones de medios de la presente invención contienen concentraciones de aminoácidos superiores a alrededor de 70 mM en los medios iniciales. Se ha demostrado que cuando las concentraciones de aminoácidos de los medios iniciales se encuentran en este rango, la densidad celular y la valoración aumentan durante todo el período de crecimiento del cultivo (ver Ejemplo 13).

[00151] Adicionalmente, en ciertas realizaciones de la presente invención, la relación molar de glutamina a asparagina en el medio de cultivo es reducida, en comparación con otros medios comerciales y no comerciales. Preferentemente, la relación molar de glutamina a asparagina en los medios de cultivo es inferior a alrededor de 2.

[00152] Además, en ciertas realizaciones de la presente invención, la relación molar de glutamina a aminoácidos totales en el medio de cultivo es reducida, en comparación con otros medios comerciales y no comerciales. Preferentemente, la relación molar de glutamina a aminoácidos totales en los medios de cultivo es inferior a alrededor de 0,2.

[00153] Una consecuencia interesante e inesperada de la disminución de la relación molar de glutamina a asparagina o a la concentración total de aminoácidos en los medios iniciales de acuerdo con la presente invención fue que, además de una disminución observada en la acumulación de amonio, se observó también una disminución en la acumulación de lactato. En ciertas realizaciones, los niveles acumulados de amonio y lactato no solo son inferiores a los de cultivos de control, sino que, de hecho, en realidad disminuyen luego de una acumulación inicial (por ejemplo, ver Ejemplos 3 y 7).

[00154] Boraston (Patente de los Estados Unidos Nro. 5 871 999) ha descripto un medio de cultivo en el cual la relación molar de

iones inorgánicos totales a aminoácidos totales es entre 1 y 10. Boraston demostró que proporcionando un medio de cultivo en el cual la relación molar de iones inorgánicos totales a aminoácidos totales se encuentre en este rango, la agregación de células CHO en el medio disminuye. En otra realización preferida de la presente invención, la relación molar de iones inorgánicos totales a aminoácidos totales en el medio de cultivo se reduce aun más, a entre aproximadamente 0,4 y 1. Como se muestra en el Ejemplo 13, la reducción de esta relación de 1,75 a aproximadamente 0,7 logra un notable aumento en la densidad celular y en la producción de polipéptido o proteína expresada durante todo el período de crecimiento del cultivo.

[00155] En otra realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo contiene una concentración de glutamina y asparagina combinadas de entre aproximadamente 16 y 36 mM. Como se muestra en el Ejemplo 14, Tabla 22, los medios que contienen una concentración total combinada de glutamina y asparagina dentro de este rango exhiben mayores valoraciones de polipéptido expresado que los medios que contienen una concentración total combinada de glutamina y asparagina fuera de este rango. El experto en el arte podrá seleccionar la concentración combinada exacta de glutamina y asparagina dentro de esta rango, a fin de optimizar el crecimiento o la viabilidad celulares, y de maximizar la producción del polipéptido expresado.

[00156] Además, el experto en el arte podrá reconocer que cualquiera de las condiciones mencionadas se puede emplear en forma individual o en varias combinaciones entre sí. Utilizando formulaciones de medios que exhiben una, algunas, o todas de las características anteriores, el experto en el arte podrá optimizar el crecimiento o la viabilidad celular, y maximizar la producción del polipéptido expresado.

[00157] Cualquiera de estas formulaciones de medios descriptas en la presente invención puede suplementarse en forma opcional,

según lo necesario, con hormonas y otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), reguladores, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados proteicos o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos, tales como hexametilen-bis(acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden agregar al comienzo del cultivo, o se pueden agregar en un punto posterior, a fin de reponer nutrientes agotados, o por alguna otra razón. El experto en el arte tendrá conocimiento de cualquier suplemento deseable o necesario que pueda incluirse en las formulaciones de medios descriptas.

Provisión de un cultivo celular de mamífero

[00158] En el arte, se conocen diversos métodos de preparación de células de mamíferos para la producción de proteínas o polipéptidos por cultivo de lote y de alimentación de lote. Como se describió con anterioridad, se puede introducir un ácido nucleico suficiente para lograr la expresión (habitualmente, un vector que contiene el gen codificador del polipéptido o de la proteína de interés y cualquier elemento de control genético funcionalmente ligado), en la línea de células huéspedes, por medio de cualquier cantidad de técnicas bien conocidas. En general, las células se someten a una identificación sistemática a fin de establecer las células huéspedes que han realmente absorbido el vector y expresan el polipéptido o la proteína de interés. Los métodos tradicionales para la detección de un polipéptido o proteína particular de interés, expresados por células de mamíferos, abarcan, sin limitación, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopia de inmunofluoresecencia, SDS-PAGE, Western blots,

ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. El experto en el arte tendrá conocimiento de otras técnicas apropiadas para la detección de proteínas o polipéptidos expresados. En el caso de que múltiples células huéspedes expresen el polipéptido o la proteína de interés, se pueden emplear algunas o todas las técnicas citadas a fin de establecer las células que expresan dicho polipéptido o proteína en los niveles más altos.

[00159] Una vez identificada una célula que expresa el polipéptido o la proteína de interés, la célula se propaga en cultivo, mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos por el experto en el arte. La célula que expresa el polipéptido o la proteína de interés habitualmente se propaga cultivándola a una temperatura y en un medio que conducen a la supervivencia, al crecimiento y la viabilidad de la célula. El volumen de cultivo inicial puede ser de cualquier tamaño, aunque a menudo es inferior al volumen del cultivo del biorreactor de producción utilizado en la producción final del polipéptido o la proteína de interés, y con frecuencia, las células se pasan varias veces en biorreactores de volumen en aumento, antes de la siembra del biorreactor de producción. El cultivo celular puede agitarse o sacudirse a fin de aumentar la oxigenación del medio y la dispersión de nutrientes en las células. Alternativa o adicionalmente, pueden emplearse aparatos especiales de riego bien conocidos en el arte, con la finalidad de aumentar y controlar la oxigenación del cultivo. De acuerdo con la presente invención, el experto en el arte entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor, entre ellas, sin limitación, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc.

[00160] La densidad celular inicial en el biorreactor de producción puede ser seleccionada por el experto en el arte.

Conforme a la presente invención, la densidad celular inicial en el biorreactor de producción puede ser tan baja como una sola célula por volumen de cultivo. En realizaciones preferidas de la presente invención, las densidades celulares iniciales en el biorreactor de producción pueden variar desde aproximadamente 2 x 10^2 células viables por ml, hasta aproximadamente 2 x 10^3; 2 x 10^4; 2 x 10^5; 2 x 10^6; 5 x 10^6; o 10 x 10^6 células viables por ml, y pueden ser aun mayores.

[00161] Los cultivos celulares iniciales e intermedios pueden desarrollarse hasta cualquier densidad deseada, antes de sembrar el siguiente biorreactor de producción intermedia o final. Se prefiere que la mayoría de las células permanezcan vivas antes de la siembra, si bien no es necesaria la viabilidad total o casi total. En una realización de la presente invención, las células se pueden extraer del sobrenadante, por ejemplo, mediante centrifugación ultra-rápida. Además puede ser conveniente lavar las células extraídas con un medio antes de la siembra del siguiente biorreactor, a fin de eliminar cualquier producto de desecho metabólico o componentes del medio indeseados. El medio puede ser aquel en el cual las células crecieron previamente, o puede ser un medio diferente, o una solución de lavado seleccionada por aquel que pone en práctica la presente invención.

[00162] Las células luego pueden diluirse hasta una densidad apropiada para la siembra del biorreactor de producción. En una realización preferida de la presente invención, las células se diluyen en el mismo medio que se utilizará en el biorreactor de producción. Alternativamente, las células se pueden diluir en otro medio o en otra solución, conforme a las necesidades y los deseos de los que pongan en práctica la presente invención, o a fin de adaptar necesidades particulares de las células en sí, por ejemplo, en el caso de que las células deban almacenarse durante

un período corto antes de la siembra del biorreactor de producción.

Fase de crecimiento inicial

[00163] Una vez que se ha sembrado el biorreactor de producción como se ha descripto, el cultivo celular se mantiene en la fase de crecimiento inicial, en condiciones que conducen a la supervivencia, al crecimiento y a la viabilidad del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán según el tipo celular, el organismo del cual deriva la célula, y la naturaleza y el carácter de la proteína o del polipéptido expresado.

[00164] De conformidad con la presente invención, el biorreactor de producción puede tener cualquier volumen apropiado para la producción de gran escala de polipéptidos o proteínas. En una realización preferida, el volumen del biorreactor de producción es por lo menos de 500 litros. En otra realización preferida, el volumen del biorreactor de producción es 1000; 2500; 5000; 8000; 10.000; 12.000 litros o más, o cualquier volumen comprendido entre estos valores. El experto en el arte tendrá conocimiento del biorreactor adecuado para el uso en la práctica de la presente invención, y podrá seleccionarlo consecuentemente. El biorreactor de producción puede estar hecho de cualquier material que conduzca al crecimiento y a la viabilidad celulares, que no interfiera con la expresión o estabilidad de la proteína o del polipéptido producidos.

[00165] La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento inicial se seleccionará principalmente sobre la base del rango de temperaturas a las cuales el cultivo celular permanece viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO crecen bien a 37°C. En general, la mayoría de las células de mamíferos crecen bien dentro de un rango de aproximadamente 25°C a 42°C. Preferentemente, las células de mamíferos crecen bien dentro del rango de aproximadamente 35°C a 40°C. El experto en el arte podrá

seleccionar la temperatura o las temperaturas apropiadas para el cultivo de las células, según las necesidades de las células y las necesidades de producción de aquel que pone en práctica la invención.

[00166] En una realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una sola temperatura constante. En otra realización, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene dentro de un rango de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede aumentar o disminuir de manera constante durante la fase de crecimiento inicial. Alternativamente, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades discontinuas, en varios momentos durante la fase de crecimiento inicial. El experto en el arte podrá determinar la conveniencia del uso de una sola temperatura o de múltiples temperaturas, y si la temperatura deberá ajustarse de manera constante o en cantidades discontinuas.

[00167] Durante la fase de crecimiento inicial, las células pueden desarrollarse una cantidad de tiempo mayor o menor, según las necesidades del que pone en práctica la invención y las necesidades de las células en sí. En una realización, las células se desarrollan durante un tiempo suficiente para lograr una densidad celular viable, que es un porcentaje determinado de la densidad celular viable máxima que las células alcanzarían finalmente si se las dejara crecer sin interrupción. Por ejemplo, las células pueden desarrollarse durante un tiempo suficiente para lograr una densidad celular viable deseada de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; ó 99 por ciento de la densidad celular viable máxima.

[00168] En otra realización, las células se dejan crecer durante un tiempo definido. Por ejemplo, conforme a la concentración inicial del cultivo celular, la temperatura a la cual las células se desarrollan y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, estas pueden desarrollarse durante 0;

1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20 o más días. En algunos casos, las células pueden dejarse crecer durante un mes, o más. Si el crecimiento de las células en un biorreactor de siembra, a la temperatura de la fase de crecimiento inicial, fuera suficiente de manera que la densidad celular viable en el biorreactor de producción en el momento de su inoculación ya estuviera en el porcentaje deseado de la densidad celular viable máxima, las células no se dejarían crecer durante ningún día en el biorreactor de producción. Aquel que lleva a la práctica la invención presente podrá seleccionar la duración de la fase de crecimiento inicial, conforme a las necesidades de producción del polipéptido o la proteína y a las necesidades de las células en sí.

[00169] El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase de cultivo inicial, a fin de aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes en las células. De acuerdo con la presente invención, el experto en el arte entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, entre ellas, sin limitación, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar suministrando una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación puede controlarse con aparatos de riego bien conocidos en el arte.

Cambio de las condiciones de cultivo

[00170] Conforme a las descripciones de la presente invención, al final de la fase de crecimiento inicial, puede cambiarse por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo juego de condiciones de cultivo y de producir un cambio metabólico en el cultivo. La acumulación de metabolitos inhibitorios, en su mayoría lactato y amoníaco, inhibe el crecimiento. Un cambio metabólico, efectuado, por ejemplo, mediante una modificación en la temperatura, el pH, la osmolalidad o el nivel de inductores químicos del cultivo

celular, puede caracterizarse por una reducción en la relación de una tasa de producción de lactato específica a una tasa de consumo de glucosa específica. En una realización, sin limitación, las condiciones de cultivo se cambian modificando la temperatura del cultivo. Sin embargo, como es sabido en el arte, la modificación de la temperatura no es el único mecanismo para lograr un cambio metabólico apropiado. Por ejemplo, dicho cambio metabólico también puede obtenerse modificando otras condiciones de cultivo, entre ellas, sin limitación, el pH, la osmolalidad y los niveles de butirato de sodio. Como se detalla con anterioridad, el momento del cambio de cultivo será determinado por aquel que lleva a la práctica la presente invención, sobre la base de las necesidades de producción de la proteína o el polipéptido, o las necesidades de las células en sí.

[00171] Al cambiar la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, el cambio de temperatura completo puede llevar varias horas o días. De manera alternativa, el cambio de temperatura puede ser relativamente abrupto. Por ejemplo, puede completarse el cambio de temperatura en menos de algunas horas. Dados la producción y el equipamiento de control apropiados, tal como es convencional en la producción de polipéptidos o proteínas de gran escala comercial, el cambio de temperatura aun puede completarse en menos de una hora.

[00172] La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento posterior se seleccionará principalmente sobre la base del rango de temperaturas a las cuales a las cuales el cultivo celular permanece viable y expresa proteínas o polipéptidos biotecnológicos en niveles adecuados desde el punto de vista comercial. En general, la mayoría de las células de mamíferos permanecen viables y expresan proteínas o polipéptidos biotecnológicos en niveles comercialmente adecuados dentro de un rango de aproximadamente 25°C a 42°C. Preferentemente, las

células de mamíferos permanecen viables y expresan proteínas o polipéptidos biotecnológicos en niveles comercialmente adecuados dentro del rango de aproximadamente 25°C a 35°C. El experto en el arte podrá seleccionar la temperatura o las temperaturas apropiadas para el cultivo de las células, según las necesidades de las células y las necesidades de producción de aquel que pone en práctica la invención.

[00173] En una realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento posterior se mantiene a una sola temperatura constante. En otra realización, la temperatura de la fase de crecimiento posterior se mantiene dentro de un rango de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede aumentar o disminuir de manera constante durante la fase de crecimiento posterior. Alternativamente, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades discontinuas, en varios momentos durante la fase de crecimiento posterior. El experto en el arte entenderá que en esta realización se contemplan múltiples cambios de temperatura discontinuos. Por ejemplo, la temperatura puede modificarse una vez, las células se pueden mantener a esta temperatura o rango de temperaturas durante un cierto período, después del cual la temperatura puede cambiarse nuevamente -a una temperatura mayor o menor. La temperatura del cultivo después de cada cambio discontinuo puede ser constante, o puede mantenerse dentro de un cierto rango de temperaturas.

[00174] En el Ejemplo 16, se expone información que demuestra la eficacia del empleo de dos cambios de temperatura sucesivos, si bien, aquellos expertos en el arte de acuerdo con la presente invención entenderán que pueden emplearse tres o más cambios de temperatura sucesivos a fin de aumentar la viabilidad o densidad celular, o a fin de aumentar la expresión de proteínas o polipéptidos biotecnológicos. La temperatura o los rangos de temperatura del cultivo celular después de cada cambio sucesivo de temperatura pueden ser superiores o inferiores a las

temperaturas o rangos de temperaturas anteriores al cambio. En una realización preferida de la presente invención, cada temperatura o rango de temperatura sucesivo es inferior a la temperatura o rango de temperaturas precedente.

Fase de producción posterior

[00175] De conformidad con la presente invención, una vez que se han cambiado las condiciones del cultivo celular como se detalla anteriormente, el cultivo celular se mantiene para una fase de producción posterior en un segundo grupo de condiciones de cultivo, que conducen a la supervivencia y a la viabilidad del cultivo celular, y apropiadas para la expresión del polipéptido o la proteína deseada en niveles comercialmente adecuados.

[00176] Como ya se analizó, el cultivo puede cambiarse modificando una o más, de una cantidad de condiciones de cultivo, entre ellas, sin limitación, la temperatura, el pH, la osmolalidad y los niveles de butirato de sodio. En una realización, se cambia la temperatura del cultivo. De acuerdo con esta realización, durante la fase de producción posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o rango de temperaturas inferior a la temperatura o rango de temperaturas de la fase de crecimiento inicial. Por ejemplo, durante la fase de producción posterior, las células CHO expresan proteínas y polipéptidos biotecnológicos dentro de un rango de 25°C a 35°C. Como se analizó anteriormente, pueden emplearse múltiples cambios de temperatura discontinuos a fin de aumentar la densidad o la viabilidad celular, o a fin de incrementar la expresión de la proteína o el polipéptido biotecnológico.

[00177] Conforme a la presente invención, las células se pueden mantener en la fase de producción posterior hasta lograr una densidad celular o valoración de producción deseada. En una realización, las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que la valoración para la proteína o polipéptido biotecnológico alcanza un máximo. En otras realizaciones, el

cultivo puede cosecharse antes de este punto, según la necesidad de producción del que pone en práctica la invención, o las necesidades de las células en sí. Por ejemplo, las células pueden mantenerse durante un tiempo suficiente para lograr una densidad celular viable de 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; ó 99 por ciento de la densidad celular viable máxima. En algunos casos, puede ser conveniente permitir que la densidad celular viable alcance un máximo, y luego, dejar declinar la densidad celular viable a cierto nivel, antes de cosechar el cultivo. En un ejemplo extremo, puede ser conveniente permitir que la densidad celular viable se acerque a cero o alcance cero, antes de cosechar el cultivo.

[00178] En otra realización de la presente invención, las células se dejan crecer durante un tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, conforme a la concentración del cultivo celular al inicio de la fase de crecimiento posterior, la temperatura a la cual las células se desarrollan y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, estas pueden desarrollarse durante 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20 o más días. En algunos casos, las células pueden dejarse crecer durante un mes, o más. Aquel que lleva a la práctica la invención presente podrá seleccionar la duración de la fase de producción posterior, conforme a las necesidades de producción del polipéptido o la proteína y a las necesidades de las células en sí.

[00179] En ciertos casos, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular, durante la fase de producción posterior, con nutrientes u otros componentes de medio que se han agotado o han sido metabolizados por las células. Por ejemplo, puede ser conveniente suplementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes de medio que, según se ha observado en el control del cultivo de células (ver la sección de "Control de las condiciones de cultivo", a continuación), se han

agotado. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular antes de la fase de producción posterior. Como ejemplos, sin limitación, puede ser beneficioso o necesario la suplementación del cultivo celular con hormonas u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), reguladores, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.

[00180] Estos componentes suplementarios pueden agregarse al cultivo celular todos juntos, de una sola vez, o pueden proporcionarse al cultivo celular en una serie de adiciones. En una realización de la presente invención, los componentes suplementarios se proveen al cultivo celular en múltiples momentos, en cantidades proporcionales. En otra realización, puede ser conveniente proporcionar solo ciertos componentes suplementarios al comienzo, y proporcionar el resto de los componentes en un momento posterior. En aun otra realización de la presente invención, el cultivo celular se alimenta de manera continua con estos componentes suplementarios.

[00181] De conformidad con la presente invención, el volumen total agregado al cultivo celular debe mantenerse óptimamente en una cantidad mínima. Por ejemplo, el volumen total del medio o solución que contiene los componentes suplementarios agregados al cultivo celular puede ser 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; ó 50% del volumen del cultivo celular antes de proporcionar los componentes suplementarios.

[00182] El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase de producción posterior, a fin de aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes en las células. De acuerdo con la presente invención, el experto en el arte entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del

biorreactor durante la fase de crecimiento posterior, entre ellas, sin limitación, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar suministrando una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación puede controlarse con aparatos de riego bien conocidos en el arte.

Control de las condiciones de cultivo

[00183] En ciertas realizaciones de la presente invención, la persona que lleva a la práctica la invención puede hallar beneficioso o necesario controlar periódicamente las condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. El control de las condiciones de cultivo celular permite que aquel que pone en práctica la invención pueda determinar si el cultivo celular produce proteína o polipéptido biotecnológico en niveles subóptimos, o si el cultivo está próximo a entrar en una fase de producción subóptima. A fin de controlar ciertas condiciones de cultivo, será necesario extraer pequeñas alícuotas del cultivo para análisis. El experto en el arte entenderá que dicha extracción potencialmente puede introducir contaminación en el cultivo celular, y observará los cuidados apropiados a fin de minimizar el riesgo de dicha contaminación.

[00184] Como ejemplo, sin limitación, puede ser beneficioso o necesario el control de la temperatura, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad celular viable integrada, los niveles de lactato, los niveles de amonio, la osmolaridad, o la valoración de la proteína o del polipéptido expresado. Se conocen bien en el arte numerosas técnicas que permitirán que la persona que lleva a la práctica la invención pueda medir estas condiciones. Por ejemplo, la densidad celular se puede medir usando un hemacitómetro, un contador Coulter, o una examinación de densidad celular (CEDEX). La densidad celular viable se puede determinar mediante la tinción de una muestra de cultivo con azul Trypan. Debido a que solo las células muertas absorben el azul Trypan, la densidad celular viable puede

establecerse por medio del recuento de la cantidad total de células, la división del número de células que absorben el colorante por el número total de células, y tomando el número recíproco. Se puede emplear HPLC para establecer los niveles de lactato, amonio, o de la proteína o el polipéptido expresado. Alternativamente, el nivel de proteína o polipéptido expresado se puede determinar mediante técnicas convencionales de biología molecular, tales como la tinción Coomassie de geles de SDS-PAGE, Western blotting, ensayos Bradford, ensayos Lowry, ensayos Biuret y absorbancia de UV. Además, puede ser beneficioso o necesario controlar las modificaciones pos-traducción de la proteína o el polipéptido expresado, entre ellas, la fosforilación y la glicosilación.

Aislación de polipéptido expresado

[00185] En general, habitualmente se deseará la aislación o purificación de proteínas o polipéptidos expresados de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, la proteína o el polipéptido expresado se secretará en el medio, y de esa manera, se podrán eliminar las células y otros sólidos, tal como por centrifugación o filtración, como una primera etapa en el proceso de purificación. Esta realización es particularmente útil cuando se emplea de conformidad con la presente invención, ya que los métodos y las composiciones que se describen en esta solicitud logran mayor viabilidad celular. Como consecuencia, mueren menos células durante el proceso de cultivo, y se liberan menos enzimas proteolíticas en el medio, que puedan disminuir potencialmente el rendimiento de la proteína o del polipéptido expresado.

[00186] Alternativamente, la proteína o el polipéptido expresado se liga a la superficie de la célula huésped. En esta realización, se elimina el medio, y las células huéspedes que expresan la proteína o el polipéptido son lisadas como una primera etapa en el proceso de purificación. La lisis de células

huéspedes de mamíferos puede lograrse de cualquier cantidad de maneras conocidas por los expertos en el arte, entre ellas, la interrupción física mediante cuentas de vidrio y la exposición a altas condiciones de pH.

[00187] La proteína o el polipéptido puede aislarse y purificarse por métodos convencionales, entre ellos, sin limitación, la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de exclusión por tamaño y de hidroxiapatita), filtración de gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación de etanol, o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (ver, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition*, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S. J. y Hames, B. D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press, 1999; y Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology* (*Methods in Enzymology Series*, Vol. 182), Acedemic Press, 1997, todos incorporados en la presente solicitud a modo de referencia). Para la cromatografía de inmunoafinidad en particular, la proteína se puede aislar mediante su unión a una columna de afinidad que comprende anticuerpos producidos contra esa proteína y fijados a un soporte estacionario. Alternativamente, pueden adherirse a la proteína marcas de afinidad, tales como una secuencia de cubierta de influenza, poli-histidina, o glutationa-S-transferasa, mediante técnicas convencionales biotecnológicas, a fin de permitir la fácil purificación mediante el pase en la columna de afinidad apropiada. Los inhibidores de proteasa, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina, pueden agregarse en cualquier etapa o en todas las etapas, a fin de reducir o eliminar la degradación del polipéptido o de la proteína durante el proceso de purificación. Se desean en particular los inhibidores de la proteasa cuando deben lisarse

las células a fin de aislar y purificar la proteína o el polipéptido expresado. El experto en el arte apreciará que la técnica de purificación exacta variará conforme al carácter del polipéptido o de la proteína por purificar, el carácter de las células desde las cuales se expresa la proteína o el polipéptido, y la composición del medio en el cual crecen las células.

Formulaciones farmacéuticas

[00188] En ciertas realizaciones preferidas de la invención, los polipéptidos o las proteínas producidas tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones de la invención descriptas anteriormente se pueden administrar a un sujeto, o pueden formularse primero para administración por cualquier vía, entre ellas, sin limitación, las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden típicamente una proteína o un polipéptido purificado, expresado desde una línea de células de mamífero; un agente de administración (es decir, un polímero catiónico, transportador molecular de péptido, surfactante, etc., como se describe con anterioridad), en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Conforme a esta solicitud, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de demora de absorción e isotónicos y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos suplementarios.

[00189] Una composición farmacéutica se formula de manera de ser compatible con su vía de administración propuesta. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden comprender los siguientes

componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; reguladores, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas descartables o viales de múltiples dosis elaborados de vidrio o plástico.

[00190] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable típicamente comprenden dispersiones o soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación improvisada de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida al punto que pueda ser fácilmente introducida en la jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y deben preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el portador pertinente puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión, y utilizando surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede

lograrse por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en las composiciones un agente que demore la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00191] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la proteína o el polipéptido purificado en la cantidad necesaria, en un solvente apropiado, con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados con anterioridad, según lo necesario, y luego efectuando la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando la proteína o el polipéptido purificado expresado desde una línea de células de mamífero, en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios, de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que logran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional, a partir de una solución de estos previamente filtrada por esterilización.

[00192] Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de administración terapéutica oral, la proteína o el polipéptido purificado puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, sellos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar empleando un portador fluido para uso como un lavado bucal. Como parte de la composición, pueden incluirse agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles o materiales coadyuvantes. Los

comprimidos, las pastillas, las cápsulas, los sellos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; un agente saborizante, tal como menta, metil salicilato o saborizante de naranja. Las formulaciones para administración oral convenientemente pueden incorporar agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal, o para mejorar la absorción.

[00193] Para administración por inhalación, las composiciones de la invención, que comprenden una proteína o un polipéptido purificado expresado desde una línea de células de mamífero y un agente de administración, preferentemente se suministran en forma de un rocío en aerosol desde un recipiente presurizado o dosificador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. La presente invención contempla en particular la administración de las composiciones empleando un rocío nasal, un inhalador u otro dispositivo directo para las vías respiratorias superiores o inferiores. Se ha demostrado que la administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra virus de la gripe induce respuestas de células T CD8, lo que indica que por lo menos algunas células del tracto respiratorio pueden absorber ADN cuando este se administra por esta vía; los agentes de administración de la invención mejorarán la absorción celular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado desde una línea de células de mamífero y un agente de

administración se formulan como partículas porosas grandes, para administración en aerosol.

[00194] La administración generalizada también puede efectuarse por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera por ser penetrada. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede realizar utilizando rocíos nasales o supositorios. Para administración transdérmica, la proteína o el polipéptido purificado y los agentes de administración se formulan en forma de ungüentos, bálsamos, geles o cremas generalmente conocidos en el arte.

[00195] Las composiciones también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

[00196] En una realización, las composiciones se preparan con portadores que protegerán el polipéptido o la proteína contra la rápida eliminación del organismo, por ejemplo, como una formulación de liberación controlada, tal como implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en el arte. Los materiales además pueden obtenerse en el mercado, de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (entre ellas, liposomas apuntados a las células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden emplearse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse conforme a métodos conocidos

por los expertos en el arte, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4 522 811.

[00197] Es conveniente formular las composiciones orales o parenterales en formas farmacéuticas unitarias, para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, como se usa en esta solicitud, se refiere a unidades físicamente separadas, adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto por ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de proteína o polipéptido activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico necesario.

[00198] La proteína o el polipéptido expresado de acuerdo con la presente invención puede administrarse con diferentes intervalos y períodos según lo necesario, por ejemplo, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas; entre 2 y 8 semanas; entre aproximadamente 3 y 7 semanas; aproximadamente 4; 5; ó 6 semanas, etc. El experto en el arte apreciará que ciertos factores pueden afectar la dosificación y el tiempo necesarios para tratar de manera eficaz un sujeto; por ejemplo, sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. En general, el tratamiento de un sujeto con una proteína o un polipéptido descripto en esta solicitud puede comprender un tratamiento individual, o en muchos casos, puede comprender una serie de tratamientos. Además, se entiende que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o de la proteína, y en forma opcional, pueden adaptarse al receptor particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis en aumento hasta lograr una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para un sujeto animal particular puede depender de una variedad de factores, entre ellos, la actividad de la proteína o el polipéptido específico empleado, la edad, el peso corporal, la

salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad por ser modulado.

[00199] La presente invención comprende el uso de composiciones de la invención para el tratamiento de animales no humanos. En consecuencia, las dosis y los métodos de administración se pueden seleccionar de acuerdo con principios conocidos de la farmacología veterinaria y la medicina. Pueden hallarse pautas, por ejemplo, en Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 8th edition*, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

[00200] Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden incluir en un recipiente, envase o dosificador, junto con instrucciones para la administración.

[00201] Debe entenderse que la descripción precedente es solo representativa, y no tiene la intención de limitar. Los métodos y materiales alternativos para llevar a cabo la invención, y además, las aplicaciones adicionales, serán evidentes para el experto en el arte, y tienen la intención de incluirse dentro de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medio mejorado 1 para proceso de alimentación de lote de anti-GDF-8

[00202] Los procesos tradicionales de alimentación de lote para el cultivo de líneas celulares poseen varias desventajas, entre ellas, el tiempo y el esfuerzo necesarios para administrar las alimentaciones, y la necesidad de equipamiento especial en biorreactores de gran escala. El objetivo fue formular un medio de lote para la producción de proteínas de interés en biorreactores de gran escala, que requiriese mínimas alimentaciones.

Materiales y métodos

[00203] Cepas y medios. Se diseñaron células de ovario de hámster chino ("CHO") de manera de expresar un anticuerpo monoclonal contra el factor 8 de diferenciación y crecimiento ("células anti-GDF-8") (ver Veldman y col., *Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor,* US 20040142382 A1). Las células anti-GDF-8 se usaron para evaluar un nuevo medio de lote. El medio 1 y el Medio 2 se compararon con la finalidad de establecer sus capacidades para sostener altas densidad y viabilidad celulares. Las composiciones de estos medios, como así también, del Medio 3, se citan en la Tabla 1. Los medios se elaboraron mediante la adición de todos los componentes, excepto $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Luego se ajustó el medio a pH 7,25, se registró la osmolaridad, y entonces se agregó $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

[00204] Condiciones de cultivo. Para los experimentos en frascos, las células anti-GDF-8 se cultivaron en frascos de agitación y se sometieron a pases, tres veces. Para los experimentos en biorreactor, las células anti-GDF-8 se cultivaron en medio durante 12 días, y se suplementaron diariamente con 2% en volumen de medio de alimentación Medio 4 20X (Tabla 3), o 3% en volumen de Medio 4 16X (Tabla 4), después del día 5. Durante los primeros cuatro días, las células se cultivaron a 37°C. El día 5, se cambió la temperatura de las células a 31°C.

[00205] Análisis de muestras. Se tomaron muestras diarias de los cultivos, y se analizaron para determinar los niveles de aminoácidos, vitaminas, hierro, fosfato, glucosa y glutamina.

Tabla 1. Composiciones de Medio 1, Medio 2 y Medio 3.

	Medio 1		**Medio 2**		**Medio 3**	
Aminoácidos	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
alanina	96,03	1,08	17,80	0,20	24,87	0,28
arginina	1186,99	6,82	347,97	2,00	423,43	2,43
asparagina•H_2	713,	4,76	75,0	0,50	173,	1,16

O	59		0		90	
ácido aspártico	318,53	2,39	26,20	0,20	52,72	0,40
cisteína•HCl•H_2O	70,01	0,40	70,19	0,40	70,01	0,40
cistina•2HCl	297,09	0,95	62,25	0,20	62,09	0,20
ácido glutámico	158,59	1,08	29,40	0,20	41,08	0,28
glutamina	1892,40	12,96	1163,95	7,97	1162,40	7,96
glicina	95,88	1,28	30,00	0,40	35,92	0,48
histidina•HCl•H_2O	369,10	1,76	46,00	0,22	75,27	0,36
isoleucina	623,63	4,76	104,99	0,80	151,90	1,16
leucina	852,31	6,51	104,99	0,80	172,69	1,32
lisina•HCl	945,96	5,20	145,99	0,80	218,38	1,20
metionina	291,82	1,96	29,80	0,20	53,55	0,36
fenilalanina	428,62	2,60	65,99	0,40	98,81	0,60
prolina	372,25	3,24	68,99	0,60	96,40	0,84
serina	904,71	8,62	126,00	1,20	273,07	2,60
treonina	513,39	4,31	94,99	0,80	132,81	1,12
triptófano	159,32	0,78	16,00	0,08	28,99	0,14
tirosina•2Na•$2H_2O$	560,81	2,15	103,79	0,40	145,10	0,56
valina	505,36	4,32	93,99	0,80	131,17	1,12

Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	2,00	8,21	0,20	0,82	0,36	1,49
pantotenato de calcio	22,02	46,27	2,24	4,71	4,03	8,47
cloruro de colina	87,67	630,74	8,98	64,60	16,11	115,92
ácido fólico	25,95	58,84	2,65	6,01	4,76	10,80
inositol	123,39	685,47	12,60	69,99	22,64	125,79
nicotinamida	19,60	160,70	2,02	16,56	3,61	29,62
piridoxal•HCl	1,99	9,83	2,00	9,85	1,99	9,83
piridoxina•HCl	18,06	87,67	0,03	0,15	1,67	8,10
riboflavina	2,20	5,85	0,22	0,59	0,40	1,06
tiamina•HCl	21,51	63,84	2,17	6,44	3,92	11,64
vitamina B12	6,93	5,12	0,78	0,58	1,34	0,99
Sales inorgánicas	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
$CaCl_2$	115,78	1,04	116,09	1,05	115,78	1,04
KCl	310,94	4,17	311,77	4,18	310,94	4,17
Na_2HPO_4	70,81	0,50	70,99	0,50	70,81	0,50
NaCl	1104,96	18,92	5539,00	94,85	3704,96	63,44
$NaH_2PO_4•H_2O$	636,33	4,61	62,49	0,45	114,33	0,83
$MgSO_4$	48,70	0,41	48,83	0,41	48,70	0,41
$MgSO_4•7H_2O$	0,03	95,00			8,60	95,00
$MgCl_2$	28,53	0,30	28,61	0,30	28,53	0,30

$NaHCO_3$	2000,00	23,81	2440,00	29,04	2440,00	29,04
Oligoelementos	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**
Selenito de sodio	28,00	161,94	5,00	28,92	7,00	40,49
$Fe(NO_3)_3 \bullet 9H_2O$	49,86	123,42	50,00	123,75	49,86	123,42
$CuSO_4$	2,69	16,80	0,80	5,00	0,97	6,06
$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	11,24	45,00			7,49	30,00
$FeSO_4 \bullet 7H_2O$	2503,85	9006,64	839,96	3021,45	1542,85	5549,81
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	2734,77	9528,82	429,96	1498,12	1383,80	4821,59
$MnSO_4 \bullet H_2O$	0,26	1,51			0,17	1,01
$Na2SiO3 \bullet 9H_2O$	210,00	739,27			140,00	492,84
$(NH4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4H_2O$	1,86	1,50			1,24	1,00
NH_4VO_3	0,98	8,33			0,65	5,56
$NiSO_4 \bullet 6H_2O$	0,20	0,74			0,13	0,49
$SnCl_2 \bullet 2H_2O$	0,18	0,80			0,12	0,53

Otros componentes	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**µM**
Hidrocortisona	0,23	0,64	0,04	0,10	0,09	0,24
Putrescina•2HCl	6,48	40,22	1,08	6,70	2,48	15,39
ácido linoleico	0,22	0,80	0,04	0,14	0,06	0,20
ácido tióctico	0,56	2,73	0,10	0,49	0,14	0,69
D-glucosa (Dextrosa)	16039,43	89107,92	6150,72	3417 0,64	11042,24	61345,76
PVA	2560		2400		2520	

	,00		,00		,00	
Insulina	54,00		10,00		14,00	
Piruvato de sodio	54,85	498,63	55,00	499,95	54,85	498,63

Resultados y conclusiones

[00206] La Figura 1 muestra que la tasa de crecimiento de células anti-GDF-8 fue similar en el Medio 1 y en el Medio 2, en los experimentos de frascos.

[00207] La Figura 2 muestra que, en biorreactores, el Medio 1 exhibió un aumento significativo en la viabilidad y la densidad celulares finales, en comparación con el Medio 3. La valoración final también aumentó de manera significativa, de 551 mg/l para el proceso de plataforma, a 976 mg/l con Medio 1 (información no expuesta). La temperatura se cambió de 37°C a 31°C el día 5. Debido al inesperado alto crecimiento celular, los cultivos se alimentaron diariamente después del día 5, ya sea con 2% en volumen de Medio 4 20 X, o 3% en volumen de Medio 4 16X. En consecuencia, este no fue un experimento de lote real, como se propuso originalmente. La asparagina y la tiamina se suplementaron al medio de alimentación, comenzando el día 10.

[00208] Al formular un medio de lote concentrado, es necesario considerar varios intereses. En primer lugar, los nutrientes concentrados podrían provocar toxicidad a las células. En los medios desarrollados en este Ejemplo, se determinó que todos los nutrientes y componentes estaban por debajo de los límites de toxicidad (información no expuesta).

[00209] En segundo lugar, el medio de lote concentrado necesariamente tiene osmolaridad superior a los medios no concentrados, lo que ha demostrado poseer efectos nocivos sobre el crecimiento y la viabilidad celulares. Este problema puede evitarse disminuyendo la cantidad de NaCl en el medio inicial. Además, el medio de lote concentrado contiene niveles insuficientes de glucosa para sostener el crecimiento durante el

período de cultivo entero. Por lo tanto, los cultivos se suplementaron diariamente después del día 5, con una alimentación de glucosa.

[00210] En tercer lugar, la insulina y la glutamina son susceptibles de degradación durante el período de cultivo de 12 días. En consecuencia, el cultivo se suplementó con estos componentes, además de la glucosa.

[00211] Finalmente, se precipitará hierro de la solución que contiene altas concentraciones de fosfato a alto pH. Este problema puede evitarse agregando hierro al final del proceso de preparación del medio, después de ajustar el pH hasta un nivel apropiado.

Ejemplo 2. Formulación de medio de alimentación concentrado (Medio 5) para células anti-GDF-8 en procesos de alimentación de lote

[00212] En el Ejemplo 1, se desarrolló un proceso de lote para el cultivo de células anti-GDF-8 usando Medio 1. Debido a la alta densidad celular obtenida durante el proceso, se determinó que aún era conveniente la suplementación de nutrientes, además de la glucosa y la glutamina. Sin embargo, la suplementación del lote con medio de alimentación Medio 4 8X logró excesiva dilución del cultivo. Se formuló un medio de alimentación más concentrado, a fin de evitar este problema.

Materiales, métodos y resultados

[00213] La Tabla 2 cita las composiciones de Medio 4A-1, Medio 4B, Oligoelementos B y Oligoelementos D utilizados en las formulaciones de las Tablas 3-7.

Tabla 2. Composiciones para Medio 4A-1, Medio 4B, Oligoelementos B y Oligoelementos D utilizados en las formulaciones de las Tablas 3-7.

	Medio 4A-1	Medio 4B	Oligoelemen	Oligoeleme

					tos B		ntos D	
Aminoácidos	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
alanina	17,80	0,20						
arginina	191,00	1,10						
asparagina•H_2O	135,00	0,90						
ácido aspártico			66,50	0,50				
ácido glutámico			29,40	0,20				
glicina	15,00	0,20						
histidina•HCl•H_2O	73,50	0,35						
isoleucina	118,00	0,90						
leucina	170,00	1,30						
lisina•HCl	182,00	1,00						
metionina	59,60	0,40						
fenilalanina	82,50	0,50						
prolina	69,00	0,60						
serina	158,00	1,50						
treonina	95,20	0,80						
triptófano	32,60	0,16						
tirosina•2Na•$2H_2O$			104,00	0,40				
valina	93,60	0,80						
Vitaminas	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
biotina	0,41	1,68						
pantotenato de calcio	4,50	9,45						
cloruro de	17,90	128,7						

colina		8						
ácido fólico			5,30	12,02				
inositol	25,20	140,00						
nicotinamida	4,00	32,79						
piridoxina•HCl	4,10	19,90						
riboflavina	0,45	1,20						
tiamina•HCl	4,40	13,06						
vitamina B12	1,40	1,03						
Oligoelementos	**µg/l**	**nM**	**mg/l**	**µM**	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ •$4H_2O$					1,24	1,00		
$CuSO_4$	0,43	2,69						
$CuSO_4$•$5H_2O$							7,49	30,00
$FeSO_4$•$7H_2O$							834	3000
$MnSO_4$•H_2O					0,17	1,01		
Na_2SiO_3•$9H_2O$					140,00	492,84		
NH_4VO_3					0,65	5,56		
$NiSO_4$•$6H_2O$					0,13	0,49		
$SnCl_2$•$2H_2O$					0,12	0,53		
$ZnSO_4$•$7H_2O$	230,00	801,39					863	3007
Otros componentes	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**
ácido linoleico			42,00	0,15				
ácido tióctico			105,00	0,51				
D-glucosa			10000	5555				

(Dextrosa)			00	,56				

Medio 4 20X

[00214] El primer medio concentrado se formuló como Medio 4 20X. En la Tabla 3 se provee la formulación de medio para Medio 4 20X.

Tabla 3. Planilla de cálculo para medio de alimentación Medio 4 20X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	31,120	g/l
	Nucellin™	40,000	ml/l
	Carga H/P	20,000	ml/l
	Carga de selenito	2,000	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,610	g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,430	g/l
	Ácido aspártico	1,330	g/l
	Ácido glutámico	0,588	g/l
	Ácido linoleico	0,840	ml/l
	Ácido tióctico	2,100	ml/l
	Tirosina·2 Na (Mw 225)	1,790	g/l
	1000X Oligoelem. B	6,000	ml/l
	Glucosa	100,000	g/l
	Glutamina	14,600	g/l
	pH a 7,0		
	Osmolaridad máx.	1064,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Agregar 108 ml Oligoelem. D, 0,25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 280 ml de carga de cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml ácido fólico 6 mM	

Observación: Nucellin™ es fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); carga H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

[00215] La formulación de medio consiste en 3 partes: I, II, III. La Parte I es la versión concentrada de Medio 4 8X con los componentes individuales de Medio 4B, excepto ácido fólico, debido a las preocupaciones sobre la solubilidad de esta vitamina. La Parte II es carga de hierro, Oligoelementos D y cisteína ácida, a fin de evitar la posible precipitación de hierro, si se agrega en la Parte I. La Parte III es la carga de

ácido fólico. La Parte I se agrega en 2% en volumen diariamente, comenzando el día 5, y las Partes II y IIII se agregan una vez el día 5 junto con la Parte I.

[00216] Se ajustó el pH final del medio de alimentación a 7,0, y la osmolaridad fue aproximadamente 1064 mOsm. Una alimentación al 2% producirá en el cultivo un incremento de osmolaridad de 14 mOsm, glucosa, 2 g/l, glutamina, 2 mM.

2. Medio 4 16X

[00217] A fin de reducir el incremento en la osmolaridad, el medio de alimentación se cambió del Medio 4 20X (2% en volumen diariamente) a medio 4 16X (3% en volumen diariamente). La formulación del medio para el Medio 4 16X se provee en la Tabla 4.

Tabla 4. Planilla de cálculo para el medio de alimentación Medio 4 16X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	24,896	g/l
	Nucellin™	32,000	ml/l
	Carga H/P	16,000	ml/l
	Carga de selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,088	g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,344	g/l
	Ácido aspártico	1,064	g/l
	Ácido glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina·2 Na (Mw 225)	1,432	g/l
	1000X Oligoelem. B	9,000	ml/l
	Glutamina	6,280	g/l
	pH a 7,0		
	Osmolaridad máx.	295,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Agregar 108 ml Oligoelem. D, 0,25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 280 ml de carga de cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml Ácido fólico 6 mM	

Observación: Nucellin™ es fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); carga H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

[00218] En este Medio 4 16X modificado, también se eliminó glucosa a fin de reducir adicionalmente la osmolaridad y proporcionar cierta flexibilidad de la alimentación de glucosa. La osmolaridad total del medio de alimentación entonces fue 295 mOsm.

3. Medio 4 16X

[00219] Se hicieron cambios a la formulación de Medio 4 16X. Se agregó solución de carga de hierro a la alimentación, para lograr una adición de 0,45 µM en cada alimentación. Además, se agregó glucosa nuevamente para lograr una adición de 1,5 g/l en cada alimentación. La formulación del medio para este Medio 4 16X modificado se proporciona en la Tabla 5.

Tabla 5. Planilla de cálculo de medio de alimentación Medio 4 16X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4À-1	24,896	g/l
	Nucellin™	32,000	ml/l
	Carga de H/P	16,000	ml/l
	Carga de selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,088	g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,344	g/l
	Ácido aspártico	1,064	g/l
	Ácido glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina·2Na (Mw 225)	1,432	g/l
	1000X Oligoelem. B	9,000	ml/l
	Glucosa	50,000	g/l
	Glutamina	7,300	g/l
	pH a 7,0		
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (carga 1 mM)	15,000	ml/l
	Osmolaridad máx.	607,000	mOsm
II	Ácido fólico	720 ml ácido fólico 6 mM	
III	Cisteína (400 mM)	Agregar 108 ml Oligoelem. D, 0,25 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 280 ml carga de cisteína	

Observación: Nucellin™ es fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); carga H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

4. Medio 4 16X

[00220] Aquí, el medio de alimentación (Medio 4 16X) se elaboró en medios combinados, en lugar de 3 alimentaciones separadas, como en los últimos varios lotes. Se realizaron los ensayos para garantizar que el ácido fólico pudiera disolverse en la concentración necesaria, y que ni el hierro ni el ácido fólico se precipitaran de la solución después de un almacenamiento a 4°C o a temperatura ambiente, durante 6 días. La formulación del medio para el Medio 4 16X combinado se provee en la Tabla 6.

Tabla 6. Planilla de cálculo de medio de alimentación Medio 4 16X

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	24,896	g/l
Nucellin™	32,000	ml/l
Carga H/P	16,000	ml/l
Carga de selenito	1,600	ml/l
PVA	2,400	g/l
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,088	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,344	g/l
Ácido aspártico	1,064	g/l
Ácido glutámico	0,470	g/l
Ácido linoleico	0,672	ml/l
Ácido tióctico	1,680	ml/l
Tirosina·2 Na (Mw 225)	1,432	g/l
Glucosa	66,700	g/l
Glutamina	7,300	g/l
Ácido fólico	70,560	mg/l
Cisteína ácida (400 mM)	6,250	ml/l
Carga $FeSO_4$ (1 mM)	23,000	ml/l
1000x Oligoelem. B	9,000	ml/l
1000x Oligoelem. D	3,300	ml/l
pH esperado 6,11	Ajustar a 7,0	
Osmolaridad máx.	724,000	mOsm

Observación: Nucellin™ es fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); carga H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

[00221] La osmolaridad final del medio fue 724 mOsm, con una adición de glucosa diaria de 2 g/l y adición de glutamina de 1,5 mM.

5. Medio 4 12X

[00222] Aquí, se hicieron varios cambios al medio de alimentación. Se usó polvo de Medio 4B en lugar de la adición de cada ingrediente individual en el Medio 4B. El polvo de Medio 4B se mezcló con glucosa y se disolvió por separado en condiciones básicas, valorando la solución a pH 10,25. Se agregaron asparagina y tiamina adicionales, ya que los resultados de los análisis de vitaminas y aminoácidos mostraron que estos dos componentes se habían agotado hacia el final del proceso de alimentación de lote. El uso de Medio 4 12X redujo adicionalmente el incremento de osmolaridad, cuando se alimentó al cultivo. La formulación del medio para el Medio 4 12X se provee en la Tabla 7.

Tabla 7. Planilla de cálculo de medio de alimentación Medio 4 12X

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	18,672	g/l
Nucellin™	24,000	ml/l
Carga de H/P	12,000	ml/l
Carga de selenito	1,200	ml/l
PVA	2,400	g/l
Asparagina, H2O	1,620	g/l
NaH2PO4,H2O	1,566	g/l
MgSO4,7H2O	0,258	g/l
Glutamina	5,475	g/l
Tiamina	0,040	g/l
Medio 4B predisuelto y glucosa	~175	ml/l
Cisteína ácida (400 mM)	4,688	ml/l
pH máx.		
Ajustar pH a 7,2 con HCl 5 N		
Carga $FeSO_4$ (1 mM)	17,250	ml/l
1000x Oligoelem. B	6,750	ml/l
1000x Oligoelem. D	2,475	ml/l
pH máx. (esperado 7,18)		
Osm máx.	566,000	
Medio 4B predisuelto y glucosa * (para 1 l de medio de alimentación)		
Agua	150 ml	
Mezcla de medio 4B (14,5 g) con	Agregar	

glucosa (38,3 g)		
Ajustar pH usando 25% NaOH hasta disolver (pH aprox. 10,25)		

Observación: Nucellin™ es fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); carga H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

[00223] La osmolaridad final fue 566 mOsm. Una alimentación diaria de 4% en volumen proporciona un incremento de osmolaridad aproximado de 8,6, un incremento de glucosa de 2 g/l y un incremento de glutamina de 1,5 mM. La formulación de medio Medio 4 12X también se conoce como Medio 5. El Medio 5 es fácil de elaborar, en comparación con el Medio 4 20X o el Medio 4 16X, y es estable durante 10 días a temperatura ambiente, o a 4°C (información no expuesta).

Ejemplo 3. Proceso de alimentación de lote careciente de glutamina, para cultivo de células anti-GDF-8

[00224] Las células CHO necesitan glutamina en el medio inicial para sobrevivir. Tradicionalmente, los niveles iniciales de glutamina han sido altos, y la glutamina se alimentaba diariamente después del día 5 hasta el final del proceso de alimentación de lote. Los procesos tradicionales de alimentación de lote normalmente logran niveles altos de lactato y amonio en los cultivos celulares, que, según se sabe, poseen efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular, la densidad celular y la expresión de proteína biotecnológica. Los procesos de alimentación de lote donde la glucosa se agrega lentamente al cultivo han demostrado disminuir la producción de lactato y mejorar el crecimiento celular, la densidad celular y la expresión de proteína biotecnológica. Sin embargo, los métodos del arte previo para la manipulación de la adición de glucosa no son prácticos para la elaboración de gran escala. Aquí, utilizando medios de cultivo con niveles iniciales inferiores de glutamina, y eliminando la glutamina de la alimentación, se

demuestra que se logran niveles inferiores de amonio y lactato, lo que conduce a mayor viabilidad celular. Además, en cultivos carecientes de glutamina, la expresión de proteína biotecnológica es mayor, y la osmolaridad final se reduce.

Materiales y métodos

[00225] Cepas y medios. Se cultivaron células anti-GDF-8 de un modo de alimentación de lote, en Medio 1, en un biorreactor de 1 l.

[00226] Condiciones de cultivo. Las células se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l. La temperatura se cambió de 37°C a 31°C, el día 4 o el día 5, según el crecimiento celular. Se evaluaron tres procesos de alimentación de lote: un proceso normal (control), un proceso sin alimentación de glutamina y un proceso careciente de glutamina. Los detalles pertinentes de estos procesos se citan en la Tabla 8 y en la Tabla 9.

Tabla 8. Proceso de alimentación de lote en biorreactores de 1 l, con proceso sin alimentación de glutamina.

	Proceso de control	Proceso sin alimentación de glutamina
Medio inicial Glutamina (mM)	13 mM	13 mM
Alimentación de glutamina	5 mM el día 4	Sin alimentación de glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con glutamina 37,5 mM)	Medio 5 sin glutamina
Esquema de alimentación	4% diariamente desde el día 5	4% diariamente desde el día 5
Cambio de temperatura a 31°C	Día 4	Día 5

Tabla 9. Proceso de alimentación de lote en biorreactores de 1 l, con proceso careciente de glutamina.

	Proceso de control	Proceso con bajo contenido de glutamina
Medio inicial Glutamina (mM)	13 mM	4 mM
Alimentación de glutamina	5 mM el día 4	Sin alimentación de glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con glutamina 37,5 mM)	Medio 5 sin glutamina
Esquema de alimentación	4% diariamente desde el día 5	4% diariamente desde el día 5
Cambio de temperatura a 31°C	Día 4	Día 5

[00227] Análisis de muestras. Se tomaron muestras diarias de los cultivos, y se analizaron para determinar los niveles de densidad celular, viabilidad celular, lactato, glutamina y amonio. También se midió diariamente la valoración de anticuerpo anti-GDF-8 expresado.

Resultados y conclusiones

[00228] La Figura 3 muestra la densidad celular de cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control o sin alimentación de glutamina. En ambos casos, la densidad celular fue similar en el transcurso del experimento.

[00229] La Figura 4 muestra el porcentaje de viabilidad celular en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control, o sin alimentación de glutamina. El cultivo sin alimentación de glutamina mostró viabilidad celular notablemente más alta hacia el final del experimento, que comenzó el día 6.

[00230] La Figura 5 muestra los niveles de amonio en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control, o sin alimentación de glutamina. El cultivo sin alimentación de glutamina mostró una notable disminución en los niveles de amonio hacia el final del experimento, que comenzó el día 4.

[00231] La Figura 6 muestra los niveles de lactato en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control, o sin alimentación de glutamina. Los niveles de lactato fueron significativamente inferiores en el cultivo sin alimentación de glutamina durante todo el curso del experimento.

[00232] La Figura 7 muestra la valoración de anticuerpo anti-GDF-8 en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control, o sin alimentación de glutamina. La valoración de anticuerpo anti-GDF-8 final fue más alta en el cultivo sin alimentación de glutamina.

[00233] La Figura 8 muestra la densidad celular de cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control o careciente de glutamina. En ambos casos, la densidad celular fue similar en el transcurso del experimento.

[00234] La Figura 9 muestra la viabilidad celular de cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control o careciente de glutamina. En ambos casos, la viabilidad celular fue similar en el transcurso del experimento.

[00235] La Figura 10 muestra los niveles de amonio en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control o careciente de glutamina. El cultivo careciente de glutamina mostró una notable disminución en los niveles de amonio durante todo el transcurso del experimento.

[00236] La Figura 11 muestra los niveles de lactato en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control o careciente de glutamina. El cultivo careciente de glutamina mostró una notable disminución en los niveles de lactato hacia el final del experimento, que comenzó el día 4.

[00237] La Figura 12 muestra la valoración de anticuerpo anti-GDF-8 en cultivos desarrollados en condiciones de alimentación de lote de control, o careciente de glutamina. La valoración de anticuerpo anti-GDF-8 final fue más alta en el cultivo careciente de glutamina.

[00238] En conjunto, estos resultados indican que los menores niveles de glutamina son beneficiosos para los cultivos celulares, y reducen la cantidad de producción de amonio, aumentan la viabilidad celular y aumentan la valoración de anticuerpo anti-GDF-8 expresado. Además, en los cultivos carecientes de glutamina, se observaron bajos niveles de lactato, posiblemente debido a la menor tasa de consumo de glucosa. Los menores niveles de lactato y amonio también poseen el efecto de reducir la osmolaridad total. Se sabe además que la mayor osmolaridad tiene efectos inhibitorios sobre la viabilidad y el crecimiento celulares. Los bajos niveles iniciales de glutamina, junto con la eliminación de la alimentación de glutamina, también poseen el efecto positivo de reducir el amonio producido como consecuencia de la degradación no enzimática de glutamina en el medio almacenado. La eliminación de glutamina en la alimentación también simplifica el proceso de cultivo de células anti-GDF-8.

00223 228

Ejemplo 4. Respuesta de células anti-GDF-8 a la dosis de hierro, en Medio 1 y Medio 2

[00239] El Medio 1 posee una concentración mucho mayor de nutrientes que el Medio 2. Se determinaron los niveles óptimos de hierro para el crecimiento celular en el Medio 1, a fin de evitar problemas por la deficiencia de hierro durante el cultivo celular.

Materiales y métodos

[00240] Se cultivaron las células anti-GDF-8 en discos para un pase, en Medio 1 o Medio 2. Se manipularon las concentraciones de hierro de estos medios agregando diferentes cantidades de solución de hierro de carga. Se midieron las densidades celulares finales por medio de CEDEX.

Resultados y conclusiones

[00241] La Figura 13 muestra la respuesta de células anti-GDF-8 a la dosis de Fe, en Medio 1 y Medio 2, con diferentes concentraciones de hierro. En el Medio 2, la densidad celular fue relativamente constante para las concentraciones de hierro que oscilaron desde 3 µM hasta 15 µM. En el Medio 1, la densidad celular aumentó con las mayores concentraciones de hierro, pero alcanzó un máximo luego de aproximadamente 5 µM. Esta diferencia podría deberse al alto contenido de nutrientes del Medio 1, lo que podría reducir la disponibilidad de hierro para las células, como consecuencia de la quelación del hierro en el medio. Estos resultados indican que los niveles de hierro deben mantenerse superiores a 5 µM, a fin de evitar problemas por la deficiencia de hierro en el Medio 1.

Ejemplo 5. Sustitución de glutamina con glutamato en el proceso de biorreactor

[00242] Se efectuaron tres experimentos a fin de evaluar los efectos de la sustitución de glutamina con glutamato, en un proceso de cultivo celular anti-Lewis Y.

Materiales y métodos

[00243] Los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores de 10 l, a pH 7,1, con oxígeno disuelto al 30% y una temperatura inicial de 37°C, con un cambio a 31°C el día 5. Los gases de riego y espacio de cabeza fueron 88% de una mezcla de 93% de aire y 7% de CO_2, y 12% de oxígeno. El medio inicial en todos los experimentos fue Medio 1, que contenía glutamina. El medio de alimentación y el esquema de alimentación, incluso las alimentaciones de glutamina y glucosa suplementarias, se muestran en la Tabla 10. Las columnas tituladas "Glutamato" se alimentaron con Medio 5 modificado, que no contenía glutamina, pero que contenía una concentración molar de glutamato igual a la concentración molar de glutamina en Medio 5 convencional. Las columnas tituladas "Glutamina" se alimentaron con Medio 5 convencional.

Tabla 10. Esquema de alimentación

Día	9040-44		9040-56		9040-64	
	Glutamato 1	Glutamina 1	Glutamato 2	Glutamina 2	Glutamato 3	Glutamina 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM gln.		5 mM gln.	3 g/l gluc. 3	7,7 mM gln. 2,9 g/l gluc.
5	3,6 g/ gluc.	5 mM gln. 5,5 g/l gluc.	3,5 g/l gluc.	5 mM gln. 6 g/l gluc.	3 g/l gluc.	3 g/l gluc.
6	12% 16X Medio 4	12% 16X Medio 4	17% Medio 5	17% 16X Medio 4	29% Medio 5	29% Medio 5
7		4 mM gln.				
8						
9		2,5 g/l gluc.				
10	10% 16X Medio 4	10% 16X Medio 4	8% Medio 5	5% 16X Medio 4		
11		1 g/l gluc.				
12						
13		1 g/l				

		gluc.				

Resultados y conclusiones

[00244] En cada experimento, la densidad celular fue similar, como se muestra en la Figura 14. Las densidades celulares fueron bajas en los experimentos de Glutamina 2 y Glutamato 2 debido a una desviación de pH a aproximadamente 6,7, el día 3 del proceso. La caída de la densidad entre los días 6 y 7 en los experimentos de Glutamina 3 y Glutamato 3 se debe a la alimentación de medio de 29% el día 6.

[00245] La Figura 15 muestra la viabilidad celular de los cultivos de alimentación de glutamato y glutamina. Las viabilidades permanecieron más altas durante la segunda mitad del proceso en los biorreactores que contenían cultivos de alimentación de glutamato.

[00246] En el Experimento 1, la valoración de anti-Lewis Y fue similar entre los cultivos de alimentación de glutamato y glutamina. La Figura 16 muestra que en los Experimentos 2 y 3, las valoraciones anti-Lewis Y son inferiores en los reactores de alimentación de glutamina. La menor valoración anti-Lewis Y observada en estos reactores podría deberse a los altos niveles de lactato producidos, como se muestra en la Figura 17.

[00247] Los biorreactores con glutamato en los medios de alimentación tienen menor concentración de amonio (Figura 18) y menor osmolaridad (Figura 19).

[00248] Se usó el ensayo de ELISA de unión para evaluar la actividad de las muestras de los experimentos de Glutamina 1 y Glutamato 1. Las actividades fueron similares: 110% de referencia para la muestra de Glutamina 1 y 122% de referencia para la muestra de Glutamato 1 (información no expuesta).

[00249] La sustitución de glutamina con glutamato en estos experimentos no tuvo un efecto significativo sobre la densidad

celular. Sin embargo, la viabilidad celular fue inferior en los biorreactores alimentados con glutamina. Los niveles de amonio, lactato y la osmolaridad fueron inferiores en los biorreactores alimentados con glutamato, en comparación con aquellos alimentados con glutamina. En promedio, la valoración anti-Lewis Y fue más alta en los biorreactores alimentados con glutamato, y la actividad fue esencialmente la misma en ambas condiciones.

Ejemplo 6. Sustitución de glucosa y glutamina en el proceso de cultivo celular anti-Lewis Y

[00250] El propósito de este experimento fue evaluar los efectos de la sustitución de glucosa y glutamina con el medio de alimentación citado en la Tabla 11 a continuación, en el cultivo de células anti-Lewis Y (ver Bogheart y col., "Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts", *Clin. Can. Res.*, 10: 4538-49 (2004)). Se midieron la densidad celular, la viabilidad celular, la valoración anti-Lewis Y y los niveles de amonio.

Materiales y métodos

[00251] El experimento se efectuó en frascos de agitación de 250 ml, con un volumen inicial de 75 ml. Todos los frascos de agitación se sembraron a 0,25 x 10^6 células/ml, en Medio 2. Los frascos se incubaron a 37°C en una incubadora de CO_2 al 7%, durante 14 días. Los días 3 y 4, los frascos se alimentaron con 5% en volumen de medio de alimentación Medio 6. La composición de Medio 6 se cita en la Tabla 11. Los días 5-13, los frascos se alimentaron con 5% en volumen de una de las soluciones de alimentación que se citan en la Tabla 12. Cada condición se efectuó por duplicado. Se tomaron muestras diariamente para los recuentos celulares por CEDEX y ensayos de amonio, glucosa y lactato.

Tabla 11. Composición de Medio 6.

Aminoácidos	**mg/l**	**mM**	**Oligoelementos**	**µg/l**	**nM**
alanina	142,48	1,60	Selenito de sodio	40,00	231,35
arginina	1528,84	8,79	$CuSO_4$	3,44	21,51
asparagina•H_2O	1080,60	7,20	$CuSO_4$•$5H_2O$	7,49	30,00
ácido aspártico	532,40	4,00	$FeSO_4$•$7H_2O$	2534	9115
cistina•2HCl	473,00	1,51	$ZnSO_4$•$7H_2O$	2704	9421
ácido glutámico	235,38	1,60	$MnSO_4$•H_2O	0,17	1,01
glutamina	4820,00	33,01	Na_2SiO_3•$9H_2O$	140	492,84
glicina	120,07	1,60	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$•$4H_2O$	1,24	1,00
histidina•HCl•H_2O	588,32	2,80	NH_4VO_3	0,65	5,56
isoleucina	944,52	7,21	$NiSO_4$•$6H_2O$	0,13	0,49
leucina	1360,75	10,39	$SnCl_2$•$2H_2O$	0,12	0,53
lisina•HCl	1456,80	8,00	$AlCl_3$•$6H_2O$	1,20	4,97
metionina	477,06	3,20	$AgNO_3$	0,17	1,00
fenilalanina	660,36	4,00	$Ba(C_2H_3O_2)_2$	2,55	9,98
prolina	552,31	4,80	KBr	0,12	1,01
serina	1264,70	12,04	$CdCl_2$•$2,5H_2O$	2,28	9,99
treonina	762,02	6,40	$CoCl_2$•$6H_2O$	2,38	10,00
triptófano	260,94	1,28	$CrCl_3$	0,32	2,02
tirosina•2Na•$2H_2O$	832,62	3,19	NaF	4,20	100,02
valina	749,21	6,40	GeO_2	0,53	5,07
			KI	0,17	1,02
Vitaminas	**mg/l**	**mM**	RbCl	1,21	10,01
biotina	3,28	0,01	$ZrOCl_2$•$8H_2O$	3,22	9,99
pantotenato de calcio	36,02	0,08			
cloruro de colina	143,28	1,03	**Otros componentes**	**µg/l**	**nM**
ácido fólico	42,43	0,10	Hidrocortisona	288	0,79
inositol	201,71	1,12	Putrescina•2 HCl	8000	49,66
nicotinamida	32,02	0,26	ácido	336,2	1,20

			linoleico	5	
piridoxina•HCl	32,82	0,16	ácido tióctico	840,63	4,08
riboflavina	3,60	0,01			
tiamina•HCl	35,22	0,10	**Otros componentes**	**mg/l**	**mM**
vitamina B12	11,21	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	33005,99	183,37
			PVA	2400,00	
Sales inorgánicas	**mg/l**	**mM**	Nucellin™	80,00	
KH_2PO_4	1635,00	12,02			
$MgSO_4•7H_2O$	171,98	0,70			

Tabla 12. Alimentaciones los días 5-13. Medio 6 modificado que no contiene glucosa ni glutamina.

GluGln	Medio modificado 6 + 43 g/l glucosa + 4,82 g/l glutamina (control)
Glu	Medio modificado 6 + 43 g/l glucosa + 4,82 g/l glutamato
GluAsp	Medio modificado 6 + 43 g/l glucosa + 4,36 g/l asparagina
GluGly Gln	Medio modificado 6 + 43 g/l glucosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GluGlu	Medio modificado 6 + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamina
GalGlu	Medio modificado 6 + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamato
GalGln	Medio modificado 6 + 43 g/l galactosa + 4,36 g/l asparagina
GalGly Gln	Medio modificado 6 + 43 g/l galactosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GalAsp	Medio 6 + 43 g/l glucosa

Resultados y conclusiones

[00252] La más alta densidad celular se observó cuando se sustituyó glutamina con glutamato o glicilglutamina, en presencia de glucosa o galactosa en el medio de alimentación. La densidad celular fue generalmente inferior en los cultivos alimentados con glucosa/glutamina, galactosa/glutamina, o glucosa solamente (Figura 20). La viabilidad final fue más alta en los cultivos alimentados con glucosa solamente, y luego, en los cultivos alimentados con glucosa/glutamato. La menor viabilidad se observó en los cultivos alimentados con glutamina o asparagina combinadas con glucosa o galactosa (Figura 21).

[00253] La valoración del día 14 fue más alta en los cultivos alimentados con glucosa/glicilglutamina y glucosa/glutamato, de aproximadamente 700 µg/ml. La valoración fue menor en los cultivos alimentados con galactosa/glicilglutamina y galactosa/asparagina, de aproximadamente 500 µg/ml. La valoración en el control de glucosa/glutamina fue aproximadamente 570 µg/ml (Figura 22).

[00254] Los menores niveles de amonio se observaron en los frascos alimentados con glucosa/glutamato o glucosa sola. Los frascos alimentados con galactosa/glutamato, glucosa/glutamina, glucosa/glicilglutamina y glucosa/asparagina mostraron niveles intermedios de amonio. Los frascos alimentados con galactosa/asparagina, galactosa/glicilglutamina y galactosa/glutamina tuvieron los niveles más altos de amonio (Figura 23).

[00255] Los niveles de glucosa permanecieron superiores a 1 g/l en todos los frascos alimentados con galactosa hasta el día 11. Desde el día 11 hasta el día 14, la glucosa en estos cultivos nunca se agotó por completo, y permaneció entre 0,6 y 1 g/l, sin diferencias significativas entre los diferentes cultivos.

[00256] Los niveles de glucosa aumentaron en todos los frascos alimentados con glucosa o glucosa combinada con otro sustrato, hasta el día 10. Desde el día 10 hasta el día 14, en estos cultivos los niveles de glucosa permanecieron bastante constantes y similares entre sí. El día 14, quedaban aproximadamente 8,4 g/l de glucosa en los cultivos alimentados con glucosa/glutamato, y quedaban aproximadamente 10,8 g/l en los cultivos alimentados solo con glucosa.

[00257] Los niveles de lactato alcanzaron un máximo de aproximadamente 2,4 g/l el día 5, cuando las condiciones fueron las mismas para todas las células, y cayeron esencialmente hasta cero en todos los cultivos, el día 14. Los niveles de lactato fueron los más altos desde el día 10 hasta el día 14 en el

control de glucosa/glutamina, pero fueron inferiores a 1 g/l en este tiempo (información no expuesta).

[00258] Todas las condiciones evaluadas en este experimento produjeron densidad celular más alta que la condición de glucosa/glutamina de control. Todas las condiciones evaluadas, excepto la condición de galactosa/asparagina, lograron superior viabilidad final en comparación con el control de glucosa/glutamina, o la condición de alimentación de galactosa/glutamina. La valoración en el control de glucosa/glutamina fue aproximadamente 570 µg/ml, en comparación con un máximo de alrededor de 700 µg/ml en la condición de alimentación de glucosa/glicilglutamina y la condición de alimentación de glucosa/glutamato.

Ejemplo 7. Evaluación de un proceso de lote careciente de glutamina, para la producción de anti-GDF-8

[00259] Los métodos típicos de producción de alimentación de lote requieren múltiples alimentaciones durante el período de cultivo. Estas alimentaciones se diseñan de manera de reemplazar los nutrientes en el medio que han sido agotados por las células, o pueden haberse degradado en el lote. Estas alimentaciones crean complicaciones cuando se amplía el proceso para ser utilizado en reactores más grandes, por ejemplo, la necesidad de un impulsor de salto (ver Figura 24). Además, las alimentaciones diluyen la cantidad de anti-GDF-8 ya secretada en el cultivo, y por lo tanto, afectan la valoración de cosecha. El uso de un proceso de lote permitiría la inoculación del biorreactor en volumen completo, en lugar de un volumen parcial, de manera de acomodar las alimentaciones, lo que eliminaría la necesidad de un impulsor de salto y reduciría en gran medida cualquier efecto de dilución sobre la productividad.

[00260] Una de las razones más importantes por las que se emplea un enfoque de alimentación de lote es la glutamina, ya que esta no es estable a 37°C, y se pensó que era necesaria su reposición durante un cultivo de lote. Sin embargo, los resultados de los Ejemplos 2; 5 y 6, donde se ensayó una estrategia de carencia de glutamina, mostraron un aumento significativo en la productividad, en comparación con un reactor de control, alimentado con glutamina. Este resultado se combinó con el proceso de lote para crear un proceso de lote careciente de glutamina, que se evaluó en este Ejemplo.

Materiales y métodos

[00261] Se cultivaron células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l, durante 12 días, de acuerdo con las siguientes cuatro condiciones de crecimiento. Los parámetros de los biorreactores para todas las condiciones se mantuvieron iguales. El oxígeno disuelto se mantuvo a no menos de 23% de saturación de aire,

mediante el riego con aire, y el pH se mantuvo a 7,00 mediante la adición de una solución que contenía bicarbonato de sodio en una concentración de 0,58 M y carbonato de sodio en una concentración de 0,71 M. La temperatura de todos los cultivos se mantuvo a 37°C durante los primeros cuatro días del lote. Al cuarto día del lote, la temperatura de todos los biorreactores se bajó a 31°C, y se mantuvo en este punto durante todo el lote. Los cultivos de control y de alimentación de lote se alimentaron con 8%; 12% y 8% del volumen total del reactor, de sus respectivos medios de alimentación, los días 5; 7; y 10, respectivamente.

[00262] 1) Control.

- Inoculación del medio Medio 7 (ver Tabla 13).
- Alimentación de Medio 8, alimentado los días 5; 7 y 10 (ver Tabla 13).
- Alimentación de 5 mM de glutamina, el día 4.
- Disminución de la temperatura a 31°C, el día 4.

[00263] 2) Alimentación de lote con carencia de glutamina.

- Inoculación del medio Medio 7, solo con 4 mM de glutamina (ver Tabla 13).
- Alimentación de Medio 8, sin glutamina, alimentado los días 5; 7 y 10 (ver Tabla 13).
- Sin alimentación de glutamina el día 4.
- Disminución de la temperatura a 31°C, el día 4.

[00264] 3) Lote con carencia de glutamina.

- Inoculación del medio, nuevo medio de lote, con solo 4 mM de glutamina (ver Tabla 13).
- Sin medio de alimentación.
- Sin alimentación de glutamina.
- Disminución de la temperatura a 31°C, el día 4.
- Adición de 5 g/l de glucosa el día 8.

[00265] 4) Lote con carencia de glutamina suplementado el día 8.

- Inoculación del medio, nuevo medio de lote, con solo 4 mM de glutamina (ver Tabla 13).

- Sin medio de alimentación.

- Sin alimentación de glutamina.

- Disminución de la temperatura a 31°C, el día 4.

- Adición de 4 g de glucosa, 375 mg de Asparagina, 3 ml de carga de $FeSO_4$ 1 mM, 3,33 ml de carga de 5 g/l de Nucellin™, 2,57 ml de 36 mg/l de Hidrocortisona y 1,0 g/l de solución de carga de Putrescina, 0,23 ml de 50 mg/l de carga de Selenito de sodio y 13,1 mg de Tiamina, el día 8.

Tabla 13. Composiciones de medios utilizados.

	MW	Medio 7	Medio 8	Medios de lote
Aminoácidos		**mM**	**mM**	**mM**
L -Alanina	89,0	1,08	2,4	0,2
L- Arginina	174,0	6,84	13,2	4
L-Asparagina•H_2O	150,0	4,76	21,4	7,5
Ácido L-Aspártico	133,0	2,40	6	1,65
L-Cisteína•HCl • H_2O	176,0	0,40	0	0,4
L-Cistina•2HCl	313	0,95	1,875	1
Ácido L-Glutámico	147,0	1,08	2,4	1,08
L-Glutamina	146,0	13,00	37,5	4
Glicina	75,0	1,28	2,4	1,54
L-Histidina•HCl•H_2O	210,0	1,76	4,2	1,76
L-isoleucina	131,0	4,76	10,8	2,83
L-leucina	131,0	6,52	15,6	4,7
Lisina•HCl	182,0	5,20	12	5,2
L-Metionina	149,0	1,96	4,8	2,6
L-Fenilalanina	165,0	2,60	6	2,2
L-prolina	115,0	3,24	7,2	4,1
L-serina	105,0	8,60	18	8,6
L-treonina	119,0	4,32	9,6	3,2
L-triptófano	204,0	0,78	1,92	1,04
L-tirosina 2Na•2H_2O	261,0	2,16	4,8	1,75
L-valina	117,0	4,32	9,6	4

Vitaminas		uM	uM	uM
Biotina	244,0	8,31	20,4	11
D-Calcio pantotenato	476,0	46,06	112,8	46,06
Cloruro de colina	139,0	632,2	1548	840
Ácido fólico	441,0	58,8	144	58,8
I-inositol	180,0	686	1680	911
nicotinamida	122,0	161,7	396	215
piridoxina•HCl	206,0	88,15	240	88
piridoxal•HCl	203,0	10	0	10
riboflavina	376,0	5,37	13,2	1,1
tiamina•HCl	337,0	63,7	274,7	117
vitamina B12	1355,0	4,9	12	7,8
Sales inorgánicas				
NaCl	58,5	18,8 mM		
KCl	74,6	4,2 mM		4,19 mM
$CaCl_2$	111	1,05 mM		1,05 mM
Selenito de sodio	173	27 ug/l	60 ug/l	60 ug/l
$NaH_2PO_4•H_2O$	142	4,68 mM	11 mM	4,68 mM
Na_2HPO_4	138	0,5 mM		0,3986 mM
$MgSO_4$	120	1,15 mM	1,05 mM	1,15 mM
$MgCl_2$	95	0,3 mM		0,3 mM
$FeSO_4•7H_2O$	278	9 uM	24,675 uM	9 uM
$Fe(NO_3)_3•9H_2O$	404	0,125 uM		0,124 um
$ZnSO_4•7H_2O$	287	9,2 uM	17 uM	9,2 um
$CuSO_4$	160	0,05 uM	0,074 uM	0,064 um
$NaHCO_3$	84	23,8 mM		23,8 mM
Otros				
Glucosa	180	16 g/l	38,3 g/l	15 g/l
Alcohol polivinílico		2,56 g/l	2,4g/l	2,56 g/l
Hidrocortisona	363	0,23 mg/l	0,43 mg/l	0,28 mg/l
Putrescina•2HCl	161	6,4 mg/l	12 mg/l	7,7 mg/l
Piruvato de sodio	110	500 uM		500 uM
Ácido linoleico	280	0,81 uM	1,8 uM	0,81 uM

Ácido tióctico	206	2,7 uM	6 uM	2,7 uM
Nucellin™		54 mg/l	120 mg/l	50 mg/l
1000x Oligoel. B		1,5 ml/l	6,75 ml/l	1,5 ml/l

Resultados y conclusiones

[00266] El crecimiento celular durante los primeros cuatro días fue similar para los procesos de control y de lote, mientras que el proceso de alimentación de lote careciente de glutamina tuvo una densidad celular levemente inferior, y se mantuvo un poco más baja durante el resto del lote. Ambos procesos de lote mantuvieron densidades celulares más altas durante todo el lote, probablemente, debido a la falta de cualquier dilución significativa (ver Figura 25). Las viabilidades de todos los cultivos fueron las mismas hasta el día 8. Sin embargo, es interesante la observación de que el día 11, la viabilidad del proceso de lote no suplementado fue inferior a los otros tres biorreactores, y terminó significativamente inferior el día final. Esto sugiere que el medio de lote aun pudo optimizarse, ya que el proceso de lote suplementado tuvo una viabilidad equivalente a los biorreactores de alimentación de lote (Figura 26).

[00267] Las células cultivadas ya sea en el proceso de lote careciente de glutamina, ya sea en el proceso de alimentación de lote careciente de glutamina, superaron a las mismas células cultivadas en el proceso de alimentación de lote de control, en términos de productividad. El proceso de alimentación de lote de control tuvo una valoración de día de cosecha de 685 µg/ml, como era esperado, mientras que el proceso de alimentación de lote careciente de glutamina tuvo una valoración de cosecha de 1080 µg/ml, aproximadamente 58% más alta que el control. Esto es similar a los resultados observados con anterioridad. El proceso de lote no suplementado, careciente de glutamina, tuvo una valoración de día de cosecha de 960 µg/ml, 40% más alta que el control, similar al proceso de alimentación de lote careciente de glutamina, mientras que el proceso de lote careciente de glutamina, suplementado, tuvo una valoración más alta, de 1296

µg/ml. Esto representa un aumento del 89% sobre el control (ver Figura 27).

[00268] Cuando se analizaron los niveles inhibitorios para las cuatro condiciones, los resultados mostraron que los niveles de lactato y amoníaco para los tres procesos carecientes de glutamina fueron significativamente más bajos que para el control. De hecho, después del día 4, esas tres condiciones dejaron de producir lactato, o comenzaron a consumir lactato, mientras que el control continuó produciendo lactato durante todo el lote (ver Figura 28). Como era esperado, los niveles de amoníaco fueron mucho más bajos en los procesos carecientes de glutamina, y declinaron después del día 4, mientras que el control continuó produciendo amoníaco (ver Figura 29).

[00269] En este Ejemplo, la combinación de un proceso de lote con una estrategia de carencia de glutamina produjo un aumento del 40% en la productividad, en comparación con el proceso de alimentación de lote de control, para las células anti-GDF-8. La información además sugiere que, con alguna optimización del medio del lote, se puede lograr un aumento de casi el doble de productividad. Este incremento en la productividad puede atribuirse a dos factores. En primer lugar, la carencia de glutamina aumenta la productividad, ya sea directamente, ya sea manteniendo los niveles de amoníaco y lactato muy bajos. En segundo lugar, porque debido a la ausencia de alimentaciones, la valoración no se diluye durante el lote. La mayor productividad, junto con la facilidad de operación inherente a un proceso de lote, hacen que esta sea una opción atractiva para la producción de polipéptidos biotecnológicos.

Ejemplo 8. Efectos de las concentraciones de glutamina y asparagina en medios de lote, sobre el proceso de cultivo de células anti-GDF-8

[00270] En los Ejemplos 2; 5 y 6, se demostró que la carencia de glutamina confería beneficios a los cultivos de alimentación

de lote en dos líneas de células, entre ellos, mayores crecimiento celular, viabilidad celular y valoración, como así también, menor producción de lactato y amonio. La asparagina también parece cumplir una función en los medios de lote.

Materiales y métodos

[00271] Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l, en Medio 9 modificado, con diferentes concentraciones de glutamina y asparagina. La composición de Medio 9 base se cita en la Tabla 14. Las variaciones experimentales sobre esta composición base se citan en la Tabla 15. Los cultivos se incubaron a 37°C durante los primeros 5 días, excepto el Reactor 4, cuya temperatura fue de 30°C durante el primer día, debido a problemas de control de temperatura. Los cultivos se cambiaron a 31°C el día 6. El día 7, se alimentaron los cultivos una vez con 5% en volumen de Medio 5 que carecía de glutamina. Los cultivos se midieron diariamente para establecer la densidad celular, la valoración de anti-GDF-8, y los niveles de lactato y amonio.

Tabla 14. Composición de Medio 9.

Aminoácidos	mg/l	mM	Oligoelementos	µg/l	nM
alanina	17,80	0,20	Selenito de sodio	69,16	400,00
arginina	696,00	4,00	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	50,00	123,76
asparagina•H_2O	3000,00	20,00	$CuSO_4$	10,24	64,00
ácido aspártico	219,45	1,65	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	99,88	400,00
cisteína•HCl•H_2O	70,40	0,40	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4170	15000
cisteína•2HCl	468,75	1,50	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2640	9200
glutamato monosódico	33,80	0,20	$MnSO_4 \cdot H_2O$	33,80	200,00
glutamina	584,00	4,00	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	284,07	1000
glicina	115,50	1,54	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	247,20	200,00
histidina•HCl•H_2O	474,60	2,26	NH_4VO_3	2,34	20,00
isoleucina	570,73	4,36	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	5,26	20,00
leucina	1030,	7,87	$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,90	4,00

	70				
lisina•HCl	1401,40	7,70	$AlCl_3•6H_2O$	0,97	4,00
metionina	387,40	2,60	KBr	0,48	4,00
fenilalanina	507,00	3,07	$CrCl_3$	15,83	100,00
prolina	539,50	4,69	NaF	0,17	4,00
serina	1052,00	10,02	GeO_2	0,42	4,00
treonina	564,80	4,75	KI	33,20	200,00
triptófano	274,16	1,34	RbCl	0,48	4,00
tirosina•2Na•$2H_2O$	745,75	2,86	H_3BO_3	12,37	200,00
valina	749,00	6,40	LiCl	0,17	4,00
Vitaminas	**mg/l**	**mM**	**Otros componentes**	**µg/l**	**nM**
biotina	2,68	0,01	Hidrocortisona	540,00	1,49
pantotenato de calcio	21,92	0,05	Putrescina•2HCl	15000	93,11
cloruro de colina	158,46	1,14	ácido linoleico	290,00	1,04
ácido fólico	25,93	0,06	ácido tióctico	716,00	3,48
inositol	163,98	0,91			
nicotinamida	26,23	0,22	**Otros componentes**	**mg/l**	**mM**
piridoxal•HCl	2,03	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	15000,00	83,33
piridoxina•HCl	36,13	0,18	PVA	2560,00	
riboflavina	2,41	0,01	Nucellin™	50,00	
tiamina•HCl	39,43	0,12	Piruvato de sodio	55,00	0,50
vitamina B12	21,17	0,02			
Sales inorgánicas	**mg/l**	**mM**			
$CaCl_2$	116,55	1,05			
KCl	312,90	4,19			
Na_2HPO_4	56,60	0,40			
NaCl	1100,00	18,80			
$NaH_2PO_4•H_2O$	645,84	4,68			
$MgSO_4$	138,00	1,15			

$MgCl_2$	28,50	0,30
$NaHCO_3$	2000,00	23,81

Tabla 15. Condiciones de glutamina y asparagina evaluadas.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Línea celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio de lote (Medio 9)					
Niveles de glutamina	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Niveles de asparagina	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
Densidad de siembra ($x10^6$/ml)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5-Glutamina, 5% el día 7					
Días de cultivo	12					

Cambio de temperatura (37-31°C)	Día 6	Día 6	Día 6	Día 5	Día 5	Día 4

Resultados y conclusiones

[00272] Las Figuras 30; 31; 32; y 33 muestran el crecimiento celular de células anti-GDF-8; la valoración de anti-GDF-8; los niveles de lactato; y los niveles de amonio, respectivamente, durante todo el transcurso de los experimentos, en las varias condiciones experimentales.

[00273] En todas las condiciones experimentales, 4 mM de glutamina es mejor que 1 mM de glutamina en todos los niveles de asparagina evaluados. En niveles de glutamina comparables, las condiciones de asparagina 12 mM y 20 mM son mejores que las condiciones de asparagina 8 mM. Se observaron menores niveles de lactato y NH_4 al final del cultivo para todas las condiciones evaluadas.

Ejemplo 9. Efectos de las concentraciones de glutamina y asparagina en medios de lote, sobre el proceso de cultivo de células anti-GDF-8

[00274] En el Ejemplo 8, se demostró que el Medio 9, que contenía una concentración inicial de glutamina de 4 mM, era más eficaz que el medio que contenía glutamina 1 mM, sin consideración de los niveles de asparagina. Este ejemplo demuestra el efecto del medio que contiene niveles de glutamina de 13 mM y varios niveles de asparagina.

Materiales y métodos

[00275] Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l, en Medio 9 modificado, con diferentes concentraciones de glutamina y asparagina, como se cita en la Tabla 16. Los cultivos se incubaron a 37°C durante los primeros 3 días. Los cultivos se cambiaron a 31°C el día 4. El día 7, se alimentaron los cultivos una vez con 5% en volumen de Medio 5 que carecía de glutamina. Los cultivos se midieron periódicamente

para establecer la densidad celular, la viabilidad celular, los niveles de lactato y amonio, los niveles de glutamina, la valoración anti-GDF-8 y la osmolaridad.

Tabla 16. Condiciones de glutamina y asparagina evaluadas.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Línea celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio de lote (Medio 9)					
Niveles de glutamina	4 mM	4 mM	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
Niveles de asparagina	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8 mM
Densidad de siembra ($x10^6$/ml)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5 careciente de glutamina, 5% el día 7					
Días de cultivo	12					
Cambio de temperatura (37-31°C)	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4

Resultados y conclusiones

[00276] Las Figuras 34; 35; 36; 37; 38; 39 y 40 muestran el crecimiento celular de células anti-GDF-8; el porcentaje de viabilidad de células anti-GDF-8; los niveles de lactato; los niveles de amonio; los niveles de glutamina; la valoración de anti-GDF-8; y la osmolaridad, respectivamente, durante todo el transcurso de los experimentos, en las varias condiciones experimentales.

[00277] Entre todas las condiciones evaluadas, solo el Medio 9 que contenía glutamina 13 mM y asparagina 20 mM mostró significativos efectos adversos sobre la valoración y el crecimiento celular. La glutamina se agotó en todos los cultivos aproximadamente en el mismo momento, sin consideración del inicio del cultivo con 4 mM o con 13 mM de glutamina. La valoración más alta anti-GDF-8 se obtuvo en cultivos que contenían glutamina 13 mM y asparagina 12 mM. Todas las condiciones de cultivo exhibieron menores niveles de lactato y amonio cerca del final

del cultivo. Los niveles de amonio fueron más altos en el cultivo que contenía glutamina 13 mM y asparagina 20 mM.

Ejemplo 10. Efecto de los niveles de asparagina y cisteína sobre la disminución observada en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

[00278] En los Ejemplos 2; 5 y 6, se demostró que los cultivos desarrollados en condiciones de carencia de glutamina exhibían menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Sin embargo, los cultivos desarrollados en Medio 9 en condiciones sin carencia de glutamina aún exhibieron menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Este efecto no se observó en otros medios, tales como el Medio 1, donde la carencia de glutamina parecía necesaria para los menores niveles de lactato y amonio. El Medio 9 y el Medio 1 difieren en los niveles de asparagina (20 mM en el Medio 9, en comparación con 11 mM total en el Medio 1 más alimentación) y cistina ácida (1,5 mM en el Medio 9, en comparación con 0,95 mM en el Medio 1). Este ejemplo evalúa si estos dos componentes fueron responsables de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del cultivo.

Materiales y métodos

[00279] Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l. Inicialmente, las células se cultivaron a 37°C, y se cambiaron a 31°C el día 4 o el día 5, a 8-10 x 10^6/ml. La Tabla 17 cita las varias condiciones experimentales evaluadas. Se tomaron muestras a diario y se guardaron para análisis de valoración por medio de HPLC de Proteína A.

Tabla 17. Condiciones de asparagina y cisteína evaluadas.

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Total Gln (mM)	Total Asn (mM)	Alimentación	
					Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4
Medio 1	13	5	29	11		

					Medio 5-Gln, 30% total	
Medio 1	4	5	4	11		
Medio de lote (Medio 9)	4	20	4	21	Medio 5-Gln, 5% día 7	
Medio 1+ 5 mM Asn + 0.5 mM Cisteína	13	10	29	16	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4
Medio de lote (Medio 9)	13	20	29	21	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4

Observación: Medio 5-Gln = Medio 5 careciente de glutamina.

Resultados y conclusiones

[00280] Las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9 exhibieron menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, sin consideración del inicio de los cultivos con 4 mM o con 13 mM de glutamina (ver Figuras 42 y 43). Como contraste, el Medio 1 solo exhibió menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo cuando los cultivos se iniciaron con 4 mM de glutamina (ver Figuras 42 y 43). La adición de asparagina y cistina adicional al Medio 1 que contenía glutamina 13 mM no produjo menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (ver Figuras 42 y 43).

[00281] Se observó que los cultivos que exhibieron menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (Medio 1 con glutamina 4 mM; Medio 9 con glutamina 4 mM; y Medio 9 con glutamina 13 mM) también tuvieron menor osmolaridad total al final del proceso de cultivo (ver Figura 47).

[00282] El Medio 9 con glutamina 4 mM exhibió la más alta valoración de anti-GDF-8, seguido del Medio 9 con glutamina 13 mM alimentado el día 4 (ver Figura 46). Teniendo en cuenta el efecto de la dilución de la alimentación, el Medio 9 que contenía

glutamina 4 mM tuvo una valoración anti-GDF-8 equivalente al Medio 9 que contenía glutamina 13 mM.

Ejemplo 11. Efecto de los niveles de aminoácidos y vitaminas sobre la disminución observada en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

[00283] El Ejemplo 10 evaluó si la diferencia en los niveles de asparagina y cisteína entre el Medio 1 y el Medio 9 eran responsables de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo en el Medio 9, que no tenía carencia de glutamina. Se determinó que estos factores no eran responsables de la disminución observada. El Medio 1 y el Medio 9 también difieren en sus concentraciones de aminoácidos y vitaminas. Este ejemplo evalúa si las diferencias en las concentraciones de aminoácidos y vitaminas entre estos dos medios fueron responsables de la disminución observada.

Materiales y métodos

[00284] Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l. Inicialmente, las células se cultivaron a 37°C, y se cambiaron a 31°C el día 4, a 8-10 x 10^6/ml. La Tabla 18 cita las varias condiciones experimentales evaluadas. Se agregaron aminoácidos, vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E (composición citada en la Tabla 19) y hierro a las varias condiciones experimentales de Medio 1, de manera que los niveles de estos componentes eran iguales a los niveles en el Medio 9. Se tomaron muestras a diario y se guardaron para análisis de valoración por medio de HPLC de Proteína A.

Tabla 18. Condiciones de aminoácidos y vitaminas evaluadas.

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Día 5	Día 7	Día 10	Día 11
Medio 1	13	5	Medio 5, 5 mM Gln, 30% total día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	
Medio 1 +	13	15	Medio 5, 5 mM Gln,	8%	12%	8%	

AA			30% total	día 4	Medio 5 8%	Medio 5	Medio 5 8%	
Medio 1+Vit,H/P,E ,Fe	13	5	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4	Medio 5 8%	12% Medio 5	Medio 5 8%	4g/l glucosa
Medio 1 + todo	13	15	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4	Medio 5 8%	12% Medio 5	Medio 5 8%	4g/l glucosa
Medio 9 con 13 mM Gln	13	20	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, día 4	Medio 5	12% Medio 5	Medio 5	

Observación: AA = Aminoácidos, H/P: = 0,036 mg/ml hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina•2HCl, E: Oligoelementos E.

Tabla 19: Composición de Oligoelementos E.

Oligoelementos	µg/l	nM
$(NH_4)6Mo_7O_{24}•4H_2O$	123,60	100,00
$AlCl_3•6H_2O$	0,48	2,00
H_3BO_3	6,18	100,00
$CrCl_3$	7,92	50,00
$CuSO_4•5H_2O$	49,94	200,00
GeO_2	0,21	2,00
KBr	0,24	2,00
KI	16,60	100,00
LiCl	0,08	2,00
$MnSO_4•H_2O$	16,90	100,00
$Na_2SiO_3•9H_2O$	142,03	500,00
NaF	0,08	2,00
NH_4VO_3	1,17	10,00
$NiSO_4•6H_2O$	2,63	10,00
RbCl	0,24	2,00
$SnCl_2•2H_2O$	0,45	2,00
Selenito de sodio	34,58	200,00

Resultados y conclusiones

[00285] Todas las condiciones evaluadas exhibieron menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, excepto el Medio 1 que contenía aminoácidos agregados, lo que indicó que los mayores niveles de aminoácidos en el Medio 9, en comparación con el Medio 1, probablemente no eran responsables de las disminuciones en los niveles de lactato y amonio (ver Figuras 49 y 50). Sin embargo, el Medio 1, que contenía vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro agregados, exhibió menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, en comparación con el Medio 1 que contenía aminoácidos agregados (ver Figuras 49 y 50). Esto indica que estos componentes pueden ser responsables de las disminuciones observadas en el Medio 9.

[00286] Los cultivos desarrollados en Medio 1 que contenía vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro agregados exhibieron los menores niveles de amonio durante todo el experimento, debido a las menores cantidades totales de asparagina y glutamina en el medio inicial (ver Figura 50).

Ejemplo 12. Efecto de los niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro sobre la disminución observada en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

[00287] En el Ejemplo 11, se determinó que los mayores niveles de vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro en el Medio 9, en relación con el Medio 1, podrían ser responsables de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Aquí, estos componentes se evaluaron de manera individual y en combinación, a fin de determinar cuáles de ellos, o si alguno de ellos, eran responsables de la disminución observada.

Materiales y métodos

00253

[00288] Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en biorreactores de 1 l. Inicialmente, las células se cultivaron a 37°C, y se cambiaron a 31°C el día 4, a 8-10 x 10^6/ml, excepto el Medio 1 que contenía oligoelementos E, que se cambió el día 4 a aproximadamente 6 x 10^6 células/ml. La Tabla 20 cita las varias condiciones experimentales evaluadas. Se agregaron hidrocortisona y putrescina a todas las condiciones del Medio 1, de manera que los niveles de estos componentes fueron iguales a los niveles en el Medio 9. Se agregaron vitaminas, oligoelementos E (composición citada en la Tabla 19) y hierro a las varias condiciones experimentales de Medio 1, de manera que los niveles de estos componentes eran iguales a los niveles en el Medio 9. Se tomaron muestras a diario y se guardaron para análisis de valoración por medio de HPLC de Proteína A.

Tabla 20. Condiciones de aminoácidos y vitaminas evaluadas.

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Cambio temp.	Día 4	Día 5	Día 7	Día 10
Medio 1 + Fe	13	15	Medio 5, 30% total	día 4	5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5
Medio 1 + E	13	15	Medio 5, 30% total	día 4	5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5

				5 mM	8%	12%	8%
Medio 1 +			Medio 5,	Gln,	Medi	Medio	Medio
Vit	13	15	30% total día 4	día 4	o 5	5	5
				5 mM	8%	12%	8%
Medio 1 +			Medio 5,	Gln,	Medi	Medio	Medio
Fe + E	13	15	30% total día 4	día 4	o 5	5	5
				5 mM	8%	12%	8%
Medio 1 +			Medio 5,	Gln,	Medi	Medio	Medio
Fe + Vit	13	15	30% total día 4	día 4	o 5	5	5
				5 mM	8%	12%	8%
Medio 1 +			Medio 5,	Gln,	Medi	Medio	Medio
E + Vit	13	15	30% total día 4	día 4	o 5	5	5
Medio 9				5 mM	8%	12%	8%
con 13 mM			Medio 5,	Gln,	Medi	Medio	Medio
Gln	13	20	30% total día 4	día 4	o 5	5	5

Observación: E: Oligoelementos E.

Resultados y conclusiones

[00289] De todas las condiciones evaluadas, solo el Medio 9 que contenía glutamina 13 mM y el Medio 1 que contenía oligoelementos E exhibieron menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (ver Figuras 54 y 55). Debe observarse que los menores niveles observados para el Medio 1 que contenía oligoelementos E podrían deberse al hecho de que, para este cultivo, se cambió la temperatura cuando las células estaban a aproximadamente 6 x 10^6 células/ml.

[00290] El Medio 9 que contenía glutamina 13 mM exhibió la más alta valoración anti-GDF-8 en comparación con cualquiera de las formulaciones de Medio 1.

Ejemplo 13. Comparación de los Medios 1; 3; y 9 en términos de crecimiento celular y valoración anti-GDF-8

[00291] Este experimento se efectuó a fin de medir las diferencias en el crecimiento celular y en la valoración anti-GDF-8 usando los Medios 1; 3; y 9.

Materiales y métodos

[00292] Se cultivaron las células anti-GDF-8 en varios medios y en las condiciones de alimentación que se citan en la Tabla 21. La información pertinente de los medios se cita en la Tabla 22. Las células se cultivaron en biorreactores de 1 l durante 12 días, y se cambiaron de 37°C a 31°C el día 4.

Tabla 21. Condiciones de alimentación y medios evaluados.

			Alimentación						
Medio	Asn	Gln	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	10% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	10% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln
Medio 1	14 mM	4 mM			8% Medio 5-Gln		12% Medio 5-Gln	8% Medio 5-Gln	
Medio 9	20 mM	4 mM				5% Medio 5-Gln			

Observación: Medio 5-Gln - Medio 5 careciente de glutamina.

Tabla 22. Resumen de medios.

Medio	Asn	Gln	Alimentación	AA (Inicial)/(Total)	Ion/Total AA
Medio 3	14 mM	4 mM	34% Medio 5-Gln	34 mM / 64 mM	1,75
Medio 9	20 mM	4 mM	5% Medio 5-Gln	91,4 mM / 94,3 mM	0,72
Medio 1	14 mM	4 mM	31,6% Medio 5-Gln	78 mM / 96,4 mM	0,74

Observación: Medio 5-Gln - Medio 5 careciente de glutamina.

Resultados y conclusiones

[00293] Las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9 exhibieron la más alta densidad celular y valoración anti-GDF-8, mientras que las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 3 exhibieron la menor densidad celular y valoración anti-GDF-8 (ver Figuras 57 y 58). El hecho de que el Medio 9 produzca resultados superiores al Medio 1 indica que es mejor proporcionar los componentes del medio en el medio inicial, en lugar de suministrarlos a través de

múltiples alimentaciones. Adicionalmente, el hecho de que tanto el Medio 1 como el Medio 9 sean más eficaces que el Medio 3 indica que la provisión de los aminoácidos en concentraciones mayores que aproximadamente 70 mM logra mejores resultados que con la provisión de aminoácidos en concentraciones inferiores a 70 mM. Finalmente, la provisión de aminoácidos en concentraciones mayores que alrededor de 70 mM en el medio inicial logra las más altas densidades celulares y valoraciones (comparar Medio 9 y Medio 1).

Ejemplo 14. Análisis estadístico de los niveles óptimos totales de glutamina y asparagina en Medio 9 para el cultivo de células anti-GDF-8 en biorreactores

Materiales y métodos

[00294] Las células anti-GDF-8 se cultivaron en biorreactores de 1 l, y se cambiaron de 37°C a 31°C los días indicados en la Tabla 23. Las valoraciones finales se sometieron a una prueba de la T, a fin de determinar el nivel óptimo de glutamina sola y el nivel óptimo total de glutamina y asparagina combinadas. La Tabla 23 resume algunas condiciones experimentales pertinentes y los resultados finales para las células anti-GDF-8 cultivadas en el Medio 9.

Tabla 23. Condiciones experimentales pertinentes y resultados finales para células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9.

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Día de cambio	Alimentación	Valoración (ug/ml)	Valoración/1200	Total Gln	Total Asn	Total Gln+Asn
Medio 9	1	8	6	5% Medio 5-Gln	615,2	0,51	1	9	10
Medio 9	1	8	6	5% Medio 5-Gln	857,1	0,71	4	9	13
Medio 9	1	12	6	5% Medio 5-Gln	947	0,79	1	13	14
Medio 9	4	12	4	5% Medio 5-Gln	1184	0,99	4	13	17

Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	769,6	0,64	1	21	22
Medio 9	4	8	5	5% Medio 5-Gln	1262,6	1,05	13	9	22
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1198	1,00	4	21	25
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1321,1	1,10	4	21	25
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1162,4	0,97	4	21	25
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1436,6	1,20	4	21	25
Medio 9	15	12	4	5% Medio 5-Gln	1638,6	1,37	13	13	26
Medio 9	13	12	4	5% Medio 5-Gln	1606,7	1,34	13	13	26
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1075,91	0,90	13	21	34
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1058,4	0,88	13	21	34
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1075,91	0,90	15	21	36
Medio 9	13	5	4	Asn, Gln, 5% Medio 5-Gln	974,52	0,81	28,5	11	39,5
Medio 9	13	20	4	Asn, Gln, 5% Medio 5-Gln	831,81	0,69	28,5	26	54,5
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30% total, 5 mM Gln día 4	975,4	0,81	28,5	26	54,5
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30% total, 5 mM Gln día 4	973,5	0,81	28,5	26	54,5

Observación: Medio 5-Gln - Medio 5 careciente de glutamina.

Resultados y conclusiones

[00295] La Figura 59 muestra las valoraciones anti-GDF-8 extrapoladas para varios niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina combinadas, totales. La Tabla 24 muestra los resultados de una prueba de la T que compara la valoración normalizada de los niveles de glutamina entre 2 y 15 mM y los niveles de glutamina fuera de este rango. La Tabla 25 muestra los resultados de una prueba de la T que compara la valoración normalizada de los niveles de glutamina y asparagina combinados entre 16 y 36 mM y los niveles de glutamina y asparagina combinados fuera de este rango.

[00296] Los resultados de ambas pruebas de la T indicaron diferencias significativas en las valoraciones anti-GDF-8 entre los dos grupos comparados. Los cultivos desarrollados en Medio 9 que contenía entre 2 y 15 mM de glutamina y entre 16 y 36 mM de glutamina y asparagina combinadas exhibieron valoraciones anti-GDF-8 más altas, en comparación con los cultivos desarrollados en medios con niveles de glutamina y de glutamina y asparagina combinados fuera de estos rangos. En todos los experimentos, los niveles de asparagina fueron mayores que 9 mM.

Tabla 24. Resultados de la prueba de la T que compara la valoración normalizada de condiciones de 2 mM < Gln < 15 mM con Gln > 15 mM, Gln<2 mM.

Valoración normalizada	Gln>15, Gln <2	2<Gln<15
Media	0,724649917	1,033147493
Variancia	0,013326655	0,036834109
Observaciones	7	12
Variancia reunida	0,028537361	
Diferencia media establecida	0	
df	17	
Estad. t	-3,839791986	
P(T<=t) unilateral	0,000656219	
t Crítica unilateral	1,739606432	
P(T<=t) bilateral	0,001312438	

t Crítica bilateral	2,109818524	

Tabla 25. Resultados de la prueba de la T que compara la valoración normalizada de condiciones de 16 mM < Gln + Asn < 36 mM con Gln + Asn > 36 mM, Gln + Asn <16 mM.

Valoración normalizada	Asn+Gln>36, Asn+Gln<16	16<Asn+Gln<36
Media	0,735066584	1,027071104
Variancia	0,012061148	0,041504987
Observaciones	7	12
Variancia reunida	0,031113044	
Diferencia media establecida	0	
df	17	
Estad. t	-3,480816823	
P(T<=t) unilateral	0,001430281	
t Crítica unilateral	1,739606432	
P(T<=t) bilateral	0,002860561	
t Crítica bilateral	2,109818524	

Ejemplo 15. Efectos del medio sobre el cultivo celular

[00297] Este ejemplo investigó el comportamiento de tres variaciones del medio de cultivo celular en escala intermedia, utilizando cultivos de siembra de alta densidad. Se esperó que todos los medios evaluados mostraran mejorías en comparación con el medio de la Fase 1 (Medio 10 alimentado con medio de alimentación Medio 11), sobre la base de la información del biorreactor de escala pequeña.

Materiales y métodos

[00298] Se evaluaron células CHO que expresaban un anticuerpo monoclonal IgG1 de péptido anti-Abeta humanizado ("células anti-ABeta"), en varios medios, como se muestra en la Tabla 26 (ver Basi y otros,"Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide", WO 02/46237). El punto final establecido de pH bajo fue 7,0, controlado con Na_2CO_3 0,95 M + K_2CO_3 0,05 M, excepto para la Fase 1, que se controló con una solución que contenía bicarbonato de sodio en una concentración de 0,58 M y carbonato de sodio en una concentración de 0,71 M. El oxígeno disuelto se controló a 30% mediante el riego a demanda con aire; la agitación fue a 60

r. p. m., y el medio de alimentación fue el Medio 5 (con o sin glutamina, según lo observado). Todos los cultivos se desarrollaron en 130 l de escala, excepto 03P49B501, que se desarrolló en una escala de 500 l. En resumen, el Medio 1 estaba enriquecido con todos los nutrientes, sin consideración de las tasas de absorción relativa, mientras que el Medio 12 se equilibró eliminando los nutrientes evidentemente innecesarios de la versión enriquecida de manera indiscriminada. Las composiciones de los Medios 10; 11; y 12 se citan en la Tabla 27.

Tabla 26. Medio inicial, cantidades de alimentación y fuentes de siembra para experimentos Piloto.

Lote Nro.	Descripción	Medio inicial	Cantidad alimentada	Gln alimentado	Fuente de siembra	Densidad de siembra (Viables/ml)
1	Fase 1	Medio 10	38% *	Sí	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
2	Medio rico, Alto Gln (1)	Medio 1	16%	Sí	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
3	Medio rico, Alto Gln (2)	Medio 1	16%	Sí	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
4	Medio rico, Bajo Gln	Medio 1	15%	No	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
5	Medio equilibrado, Bajo Gln (1)	Medio 12	10%	No	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
6	Medio equilibrado, Bajo Gln (2)	Medio 12	9%	No	Bolsas "Wave"	0,2 x 10^6
7	Medio equilibrado, Bajo Gln, Siembra densa	Medio 12	5%	No	Biorreactor alta densidad	2,0 x 10^6

* El proceso de Fase 1 se alimentó con Medio 12, que no es tan rico como el Medio 5.

Tabla 27. Composiciones de Medios 10; 11; y 12.

	Medio 10		Medio 11		Medio 12	
Aminoácidos	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
alanina	24,87	0,28	142,48	1,60	17,80	0,20
arginina	423,43	2,43	1528,84	8,79	696,00	4,00
asparagina•H_2O	173,90	1,16	1080,60	7,20	1500,00	10,00
ácido aspártico	52,72	0,40	532,40	4,00	219,45	1,65
cisteína•HCl•H_2O	70,01	0,40			70,40	0,40
cisteína•2HCl	62,09	0,20	470,00	1,50	312,50	1,00
ácido glutámico	41,08	0,28	235,38	1,60		
glutamato monosódico					33,80	0,20
glutamina	1162,40	7,96	6000,00	41,10	584,00	4,00
glicina	35,92	0,48	120,07	1,60	115,50	1,54
histidina•HCl•H_2O	75,27	0,36	588,32	2,80	369,60	1,76
isoleucina	151,90	1,16	944,52	7,21	370,73	2,83
leucina	172,69	1,32	1360,75	10,39	615,70	4,70
lisina•HCl	218,38	1,20	1456,80	8,00	946,40	5,20
metionina	53,55	0,36	477,06	3,20	387,40	2,60
fenilalanina	98,81	0,60	660,36	4,00	363,00	2,20
prolina	96,40	0,84	552,31	4,80	471,50	4,10
serina	273,07	2,60	1264,70	12,04	903,00	8,60
treonina	132,81	1,12	762,02	6,40	380,80	3,20
triptófano	28,99	0,14	260,94	1,28	212,16	1,04
tirosina•2Na•$2H_2O$	145,10	0,56	832,62	3,19	456,75	1,75
valina	131,17	1,12	749,21	6,40	468,00	4,00
Vitaminas	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**µM**	**mg/l**	**µM**
biotina	0,36	1,49	3,28	13,45	2,68	11,00
pantotenato de calcio	4,03	8,47	36,02	75,67	21,93	46,06
cloruro de	16,11	115,	143,2	1030	116,7	840,

colina		92	8		6	00
ácido fólico	4,76	10,80	42,43	96,22	25,93	58,80
inositol	22,64	125,79	201,71	1120	163,98	911,00
nicotinamida	3,61	29,62	32,02	262,44	26,23	215,00
piridoxal•HCl	1,99	9,83			2,03	10,00
piridoxina•HCl	1,67	8,10	32,82	159,31	18,13	88,00
riboflavina	0,40	1,06	3,60	9,58	0,41	1,10
tiamina•HCl	3,92	11,64	35,22	104,51	39,43	117,00
vitamina B12	1,34	0,99	11,21	8,27	10,57	7,80
Sales inorgánicas	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
$CaCl_2$	115,78	1,04	113,27	1,02	116,55	1,05
KCl	310,94	4,17			312,90	4,19
KH_2PO_4			1640,00	12,06		
Na_2HPO_4	70,81	0,50			56,60	0,40
NaCl	3704,96	63,44				
$NaH_2PO_4•H_2O$	114,53	0,83			645,84	4,68
$MgSO_4$	48,70	0,41			138,00	1,15
$MgSO_4•7H_2O$	8,60	0,03	170,00	0,69		
$MgCl_2$	28,53	0,30			28,50	0,30
$NaHCO_3$	1220,00	14,52			2000,00	23,81
Oligoelementos	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**	**µg/l**	**nM**
Selenito de sodio	7,00	40,49	40,00	231,35	53,65	310,27
$Fe(NO_3)_3•9H_2O$	49,86	123,42			50,00	123,76
$CuSO_4$	0,97	6,06	3,44	21,51	10,00	62,50
$CuSO_4•5H_2O$	7,49	30,00	7,49	30,00	49,94	200,00
$FeSO_4•7H_2O$	1542	5549	2534	9115	3366	12000
$ZnSO_4•7H_2O$	1383	4821	2704	9421	2640	9198
$MnSO_4•H_2O$	0,17	1,01	0,17	1,01	16,90	100,00
$Na_2SiO_3•9H_2O$	140	492,84	140,00	492,84	142,03	500,00
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}•4H_2O$	1,24	1,00	1,24	1,00	123,60	100,00

NH_4VO_3	0,65	5,56	0,65	5,56	1,17	10,00
$NiSO_4 \bullet 6H_2O$	0,13	0,49	0,13	0,49	2,63	10,00
$SnCl_2 \bullet 2H_2O$	0,12	0,53	0,12	0,53	0,45	2,00
$AlCl_3 \bullet 6H_2O$			1,20	4,97	0,48	2,00
$AgNO_3$			0,17	1,00		
$Ba(C_2H_3O_2)_2$			2,55	9,98		
KBr			,12	1,01	0,24	2,00
$CdCl_2 \bullet 2,5H_2O$			2,28	9,99		
$CoCl_2 \bullet 6H_2O$			2,38	10,00		
$CrCl_3$			0,32	2,02	7,92	50,00
NaF			4,20	100,02	0,08	2,00
GeO_2			0,53	5,07	0,21	2,00
KI			0,17	1,02	16,60	100
RbCl			1,21	10,01	0,24	2,00
$ZrOCl_2 \bullet 8H_2O$			3,22	9,99		
$H3BO_3$					6,18	100,00
LiCl					0,08	2,00
Otros componentes	**µg/l**	**µM**	**µg/l**	**µM**	**µg/l**	**µM**
Hidrocortisona	86,40	,24	288,00	0,79	360,00	0,99
Putrescina•2HCl	2480	15,39	8000	49,66	10000	62,07
ácido linoleico	56,69	0,20	336,25	1,20	290,00	1,04
ácido tióctico	141,71	0,69	840,63	4,08	716,00	3,48
Otros componentes	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**	**mg/l**	**mM**
D-glucosa (Dextrosa)	11042,24	61,35	43005,99	238,92	15000,00	83,33
PVA	2520,00		2400,00		2560,00	
Nucellin™	14,00		80,00		50,00	
Piruvato de sodio	54,85	0,50			55,00	0,50

Resultados y conclusiones

[00299] Los cambios en el medio condujeron a la mejoría uniforme durante el transcurso de estos experimentos. En términos de crecimiento celular, viabilidad, menores niveles de lactato, menores niveles de amonio y valoración, los menores niveles de glutamina fueron mejores que los elevados (ver Figuras 60-64), y

el medio equilibrado (lote) fue mejor que el medio rico (Medio 1; ver Figuras 60-64). Los cultivos iniciados con alta densidad de inóculo exhibieron valoración final más alta que los cultivos iniciados con inóculos de menor densidad (ver Figura 64).

[00300] A diferencia de lo observado en biorreactores de pequeña escala, el primer medio (Medio 1 con alto Gln) logró menores valoraciones que el proceso original (ver Figura 64). Tampoco hubo cambio de absorción de lactato después del cambio de temperatura (ver Figura 62). Esto sugiere que puede haber algo de sensibilidad de escala con este medio. Esta conclusión es apoyada por experimentos paralelos de escala pequeña (2 l) que se realizaron junto con estos experimentos de escala intermedia (información no expuesta). Las formulaciones del medio posterior que contenían menos glutamina no fueron sensibles a la escala, por lo menos en estos experimentos (ver Figuras 60-65). Los procesos duplicados (Lotes 2 y 3, y Lotes 5 y 6) muestran muy buena capacidad de reproducción de experimento en experimento (ver Figuras 60-65), lo que aumenta la confianza en toda la información reunida en esta campaña.

Ejemplo 16. Producción de TNFR-Ig usando Medio 9

Materiales y métodos

[00301] Se sembraron células CHO que expresaban una proteína de fusión dímera que consistía en la porción de unión de ligando extracelular del receptor de factor de necrosis tumoral humano de 75 kilodaltones (p75) (TNFR), unida a la porción Fc de IgG1 ("células TNFR-Ig"), a alta densidad, desde un biorreactor de perfusión, y se diluyeron a 3 x 10^6 células viables/ml en Medio 9, para la etapa de producción de biorreactor.

Resultados y conclusiones

[00302] Las Figuras 66; 67; 68; 69; 70; 71; y 72 muestran el crecimiento celular, la viabilidad celular, la glucosa residual, los niveles de glutamina, la concentración de lactato, la concentración de amonio y la valoración de producto relativa,

respectivamente. En el rango de modificaciones menores al proceso, todas las condiciones lograron buen crecimiento celular, alta viabilidad celular y alta valoración final general.

[00303] Para todas las condiciones de este experimento, el subproducto lactato metabólico inhibitorio se consumió, o su concentración se estabilizó, lo que sugiere que la producción de lactato se detuvo. Asimismo, para el metabolito amonio inhibitorio, los niveles inicialmente se elevaron, pero en algún momento después del cambio de temperatura, el amonio comenzó a ser consumido por las células. En este Ejemplo, los cultivos de células TNFR-Ig se sometieron a los inductores químicos butirato de sodio y HMBA.

Ejemplo 17. Comparación de condiciones de cultivo de escala grande y pequeña

Materiales y métodos

[00304] A fin de establecer si el tamaño del cultivo afectaba las características del cultivo pertinente, se cultivaron células anti-GDF-8 en biorreactores de escala pequeña de 1 l, o en biorreactores de escala grande de 6000 l. Las células se cultivaron a 37°C y se cambiaron a 31°C el día 4.

Resultados y conclusiones

[00305] Como puede observarse en las Figuras 73; 74; 75; y 76 (que muestran la densidad celular, la valoración, los niveles de lactato y los niveles de amonio, respectivamente), no hubo diferencias pertinentes entre los cultivos de escala grande de 6000 l y los cultivos de escala pequeña de 1 l, para estas características. Tanto los niveles de lactato como los de amonio comenzaron a disminuir después del cambio de temperatura el día 4. Este ejemplo demuestra que el tamaño del cultivo no afecta la densidad celular, la viabilidad celular, los niveles de lactato y los niveles de amonio, cuando los cultivos son sometidos a las mismas condiciones de crecimiento.

REIVINDICACIONES

Lo que se reclama es:

1. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene glutamina, y que tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en: 1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 5) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

2. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; y

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 2) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 3) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

3. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2;

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 3) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible

máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

4. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2;

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se

reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

5. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1;

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

6. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM;

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos

totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

7. El método de la reivindicación 1, donde dicha condición de cultivo celular, en dicha etapa de cambio de por lo menos una de las condiciones del cultivo, se selecciona del grupo que consiste en: 1) la temperatura; (2) el pH; 3) la osmolalidad; 4) el nivel de inductores químicos; y sus combinaciones.

8. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 13 mM.

9. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 10 mM.

10. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 7 mM.

11. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 4 mM.

12. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 13 mM.

13. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 10 mM.

14. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 7 mM.

15. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 4 mM.

16. El método de la reivindicación 1, donde la glutamina solo se provee en el medio inicial, al comienzo del cultivo celular.

17. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de hierro soluble en el medio es mayor que 5 µM.

18. El método de la reivindicación 1, donde la densidad celular viable de dicho cultivo se mide periódicamente.

19. El método de la reivindicación 1, donde la viabilidad de dicho cultivo se mide periódicamente.

20. El método de la reivindicación 1, donde dichos niveles de lactato de dicho cultivo se miden periódicamente.

21. El método de la reivindicación 1, donde dichos niveles de amonio de dicho cultivo se miden periódicamente.

22. El método de la reivindicación 1, donde dicha valoración de dicho cultivo se mide periódicamente.

23. El método de la reivindicación 1, donde la osmolaridad de dicho cultivo se mide periódicamente.

24. El método de las reivindicaciones 18-23, donde dichas mediciones se toman diariamente.

25. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^2 células/ml.

26. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^3 células/ml.

27. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^4 células/ml.

28. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^5 células/ml.

29. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^6 células/ml.

30. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 5 x 10^6 células/ml.

31. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 10 x 10^6 células/ml.

32. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 1000 l de un cultivo.

33. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 2500 l de un cultivo.

34. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 5000 l de un cultivo.

35. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 8000 l de un cultivo.

36. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 10.000 l de un cultivo.

37. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 12.000 l de un cultivo.

38. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 30 a 42 grados Celsius.

39. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 32 a 40 grados Celsius.

40. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 34 a 38 grados Celsius.

41. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 36 a 37 grados Celsius.

42. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 37 grados Celsius.

43. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 25 a 41 grados Celsius.

44. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 27 a 38 grados Celsius.

45. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 29 a 35 grados Celsius.

46. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 29 a 33 grados Celsius.

47. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 30 a 32 grados Celsius.

48. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 31 grados Celsius.

49. El método de la reivindicación 1, que además comprende una segunda etapa de cambio posterior a dicho primer cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, que comprende el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un tercer conjunto de condiciones al cultivo.

50. El método de la reivindicación 49, donde la segunda etapa de cambio comprende el cambio de por lo menos una condición de cultivo seleccionada del grupo que consiste en: 1) la temperatura; (2) el pH; 3) la osmolalidad; 4) el nivel de inductores químicos; y sus combinaciones.

51. El método de la reivindicación 49, donde dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer rango de temperatura que es de aproximadamente 25 a 40 grados Celsius.

52. El método de la reivindicación 49, donde dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer rango de temperatura que es de aproximadamente 27 a 37 grados Celsius.

53. El método de la reivindicación 49, donde dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer rango de temperatura que es de aproximadamente 29 a 34 grados Celsius.

54. El método de la reivindicación 49, donde dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer rango de temperatura que es de aproximadamente 30 a 32 grados Celsius.

55. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es entre 0 y 8 días.

56. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es entre 1 y 7 días.

57. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es entre 2 y 6 días.

58. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es entre 3 y 5 días.

59. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es de aproximadamente 4 días.

60. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es de aproximadamente 5 días.

61. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es de aproximadamente 6 días.

62. El método de la reivindicación 1, donde el total de dicho primer período y dicho segundo período es por lo menos 5 días.

63. El método de la reivindicación 1, donde, en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, el nivel de lactato disminuye después de que el nivel de lactato en el cultivo alcanza un nivel máximo.

64. El método de la reivindicación 1, donde, en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, el nivel de amonio disminuye después de que el nivel de amonio en el cultivo alcanza un nivel máximo.

65. El método de la reivindicación 1, donde dicha cantidad total de dicho polipéptido producido es por lo menos 1,5 veces mayor que la cantidad de polipéptido producido en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dichas características del medio.

66. El método de la reivindicación 1, donde dicha cantidad total de dicho polipéptido producido es por lo menos 2 veces mayor que la cantidad de polipéptido producido en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dichas características del medio.

67. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo celular se provee además con componentes suplementarios.

68. El método de la reivindicación 67, donde dichos componentes suplementarios se proveen en múltiples intervalos.

69. El método de la reivindicación 67, donde dichos componentes suplementarios se seleccionan de un grupo que consiste en hormonas u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), reguladores, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.

70. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, y que tiene por lo menos dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

71. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, y que tiene por lo menos tres características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

72. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, y que tiene por lo menos cuatro características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un

segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

73. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, caracterizado por: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

74. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene glutamina, y que tiene una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina, por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

75. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio comprende un medio que contiene glutamina y que tiene una característica de medio seleccionada del grupo que consiste en:

1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina inicial a asparagina inicial inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina inicial a aminoácidos totales iniciales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico inicial a aminoácidos totales iniciales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina inicial y asparagina inicial superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones.

76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 70-75, donde:

los niveles de lactato son inferiores a aquellos niveles observados en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio;

los niveles de amonio son inferiores a aquellos niveles observados en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio; y

la cantidad total de polipéptido producido es por lo menos tan alta como aquella observada en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio.

77. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo no es suplementado con componentes adicionales durante el transcurso de la producción de dicho polipéptido.

78. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo no es suplementado con glutamina adicional durante el transcurso de la producción de dicho polipéptido.

79. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina en dicho cultivo se agota sustancialmente antes de dicha etapa de cambio a un segundo conjunto de condiciones de cultivo.

80. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina en dicho cultivo se agota sustancialmente, aproximadamente en el mismo momento que dicha etapa de cambio a un segundo conjunto de condiciones de cultivo.

81. El método de la reivindicación 1, donde se sustituye la glutamina con glicilglutamina en dicho cultivo.

82. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio contiene:

1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a

aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina, por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM.

83. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio contiene:

1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 3) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; y 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina, por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM.

84. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mM.

85. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mM.

86. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total inicial de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mM.

87. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total inicial de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mM.

88. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en:

(1) una cantidad total acumulada de histidina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,7 mM;

(2) una cantidad total acumulada de isoleucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 3,5 mM;

(3) una cantidad total acumulada de leucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 5,5 mM;

(4) una cantidad total acumulada de metionina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM;

(5) una cantidad total acumulada de fenilalanina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(6) una cantidad total acumulada de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(7) una cantidad total acumulada de triptófano, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,0 mM;

(8) una cantidad total acumulada de tirosina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM; y

(9) una cantidad total acumulada de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM.

89. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en:

(1) una cantidad inicial de histidina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,7 mM;

(2) una cantidad inicial de isoleucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 3,5 mM;

(3) una cantidad inicial de leucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 5,5 mM;

(4) una cantidad inicial de metionina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM;

(5) una cantidad inicial de fenilalanina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(6) una cantidad inicial de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(7) una cantidad inicial de triptófano, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,0 mM;

(8) una cantidad inicial de tirosina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM; y

(9) una cantidad inicial de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM.

90. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de serina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 7 mM.

91. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de serina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 10 mM.

92. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 8 mM.

93. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 12 mM.

94. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total inicial de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 8 mM.

95. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total inicial de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 12 mM.

96. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de fósforo, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 2,5 mM.

97. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de fósforo, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 5 mM.

98. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de glutamato, por unidad de volumen en dicho medio, es menor que aproximadamente 1 mM.

99. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de pantotenato de calcio, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 8 mg/l.

100. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de pantotenato de calcio, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 20 mg/l.

101. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de nicotinamida, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 7 mg/l.

102. El método de la rei0indicación 1, donde la cantidad total acumulada de nicotinamida, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mg/l.

103. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de piridoxina y piridoxal, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 5 mg/l.

104. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de piridoxina y piridoxal, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

105. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de riboflavina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 1,0 mg/l.

106. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de riboflavina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 2,0 mg/l.

107. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de clorhidrato de tiamina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 7 mg/l.

108. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de clorhidrato de tiamina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

109. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o las reivindicaciones 77-108, en donde el polipéptido es anti-GDF-8.

110. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o las reivindicaciones 77-108, en donde el polipéptido es anti-LewY.

111. El método de la reivindicación 24, en donde el polipéptido es anti-GDF-8.

112. El método de la reivindicación 24, en donde el polipéptido es anti-LewY.

113. El método de la reivindicación 76, en donde el polipéptido es anti-GDF-8.

112. El método de la reivindicación 76, en donde el polipéptido es anti-LewY.

290

FIG. 1

Comparación del Medio 1 y el Medio 2 en frascos de agitación, usando células anti-GDF-8.

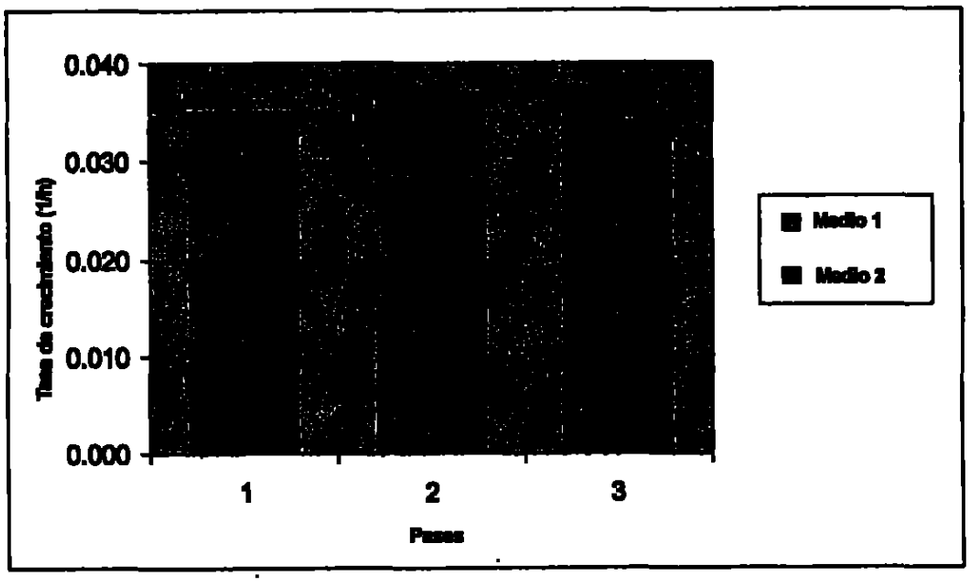


FIG. 2

Crecimiento celular y viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 1

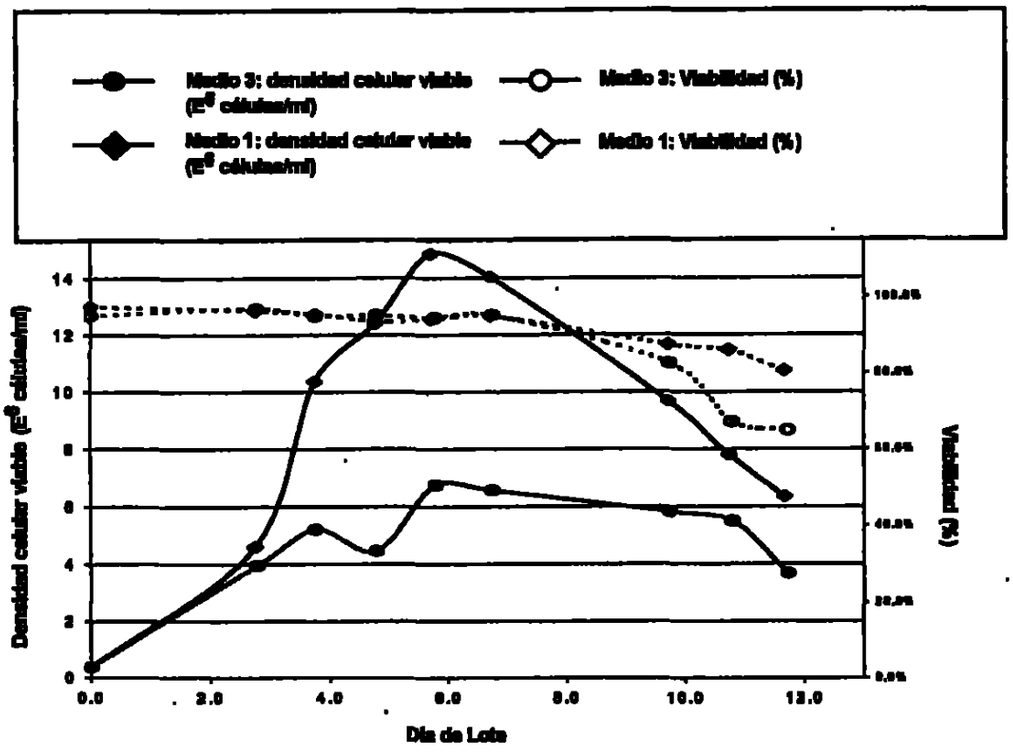


FIG. 3

Crecimiento celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control

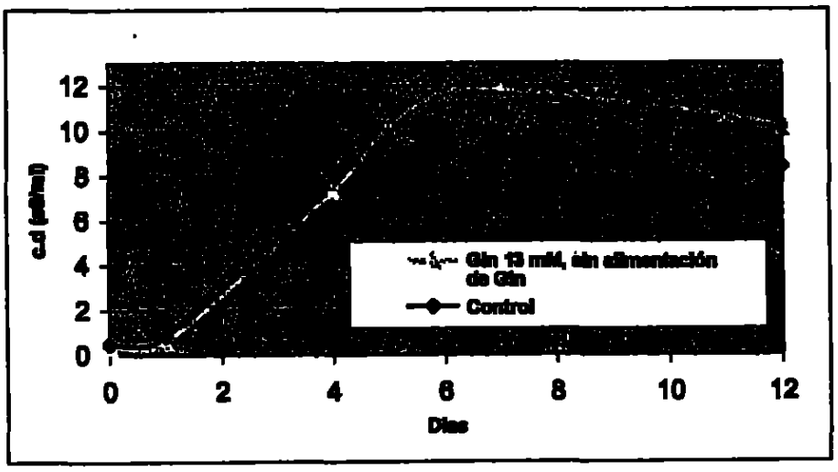


FIG. 4

Viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control

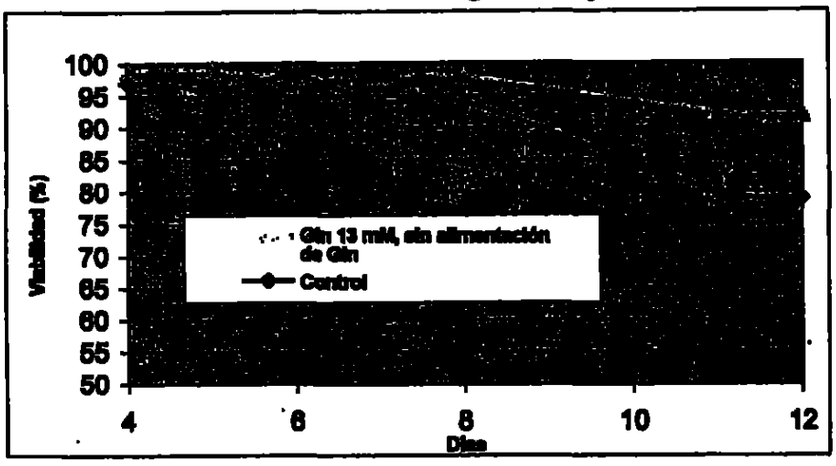


FIG. 5

Niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control

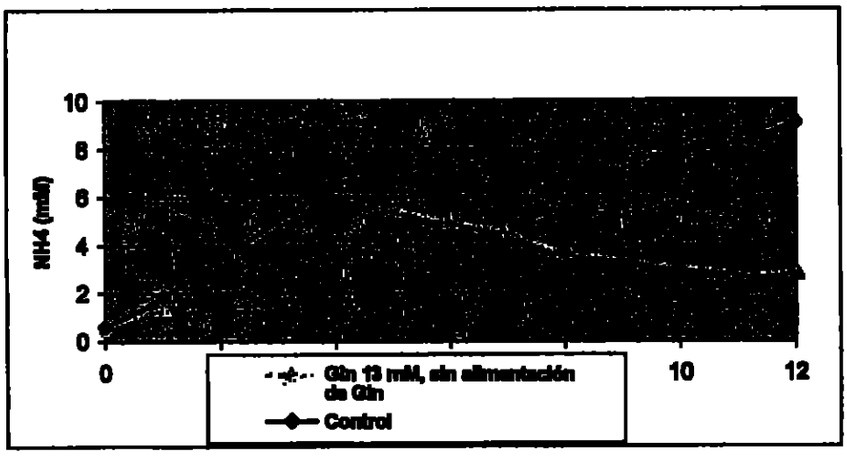


FIG. 6

Niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control

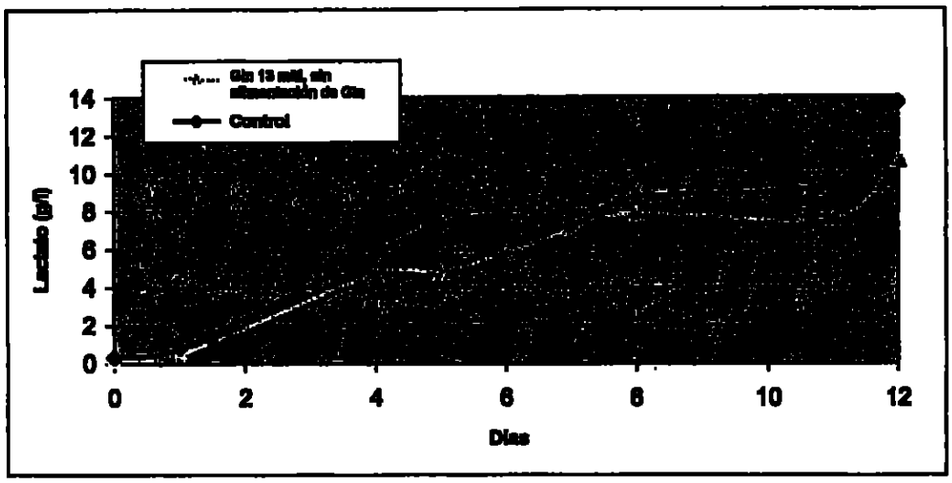


FIG. 7

Valoración anti-GDF-8 en condiciones de cultivo sin alimentación de glutamina y de control

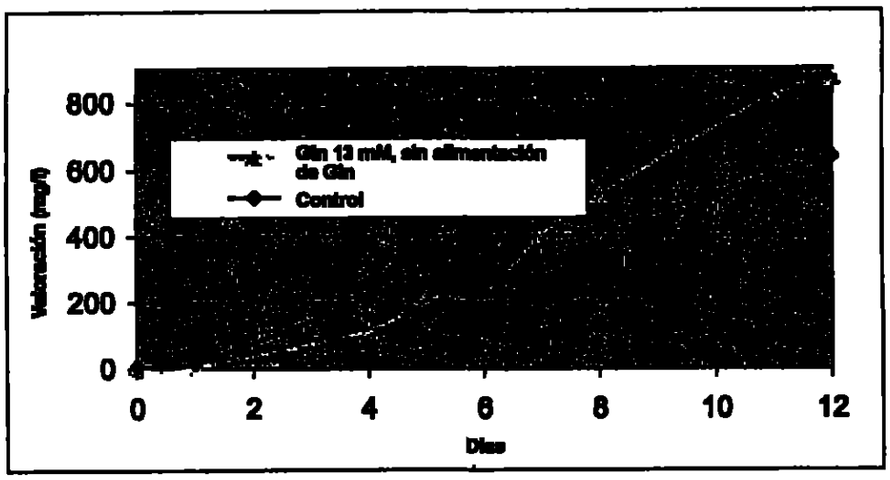


FIG. 8

Densidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de alimentación careciente de glutamina y de control

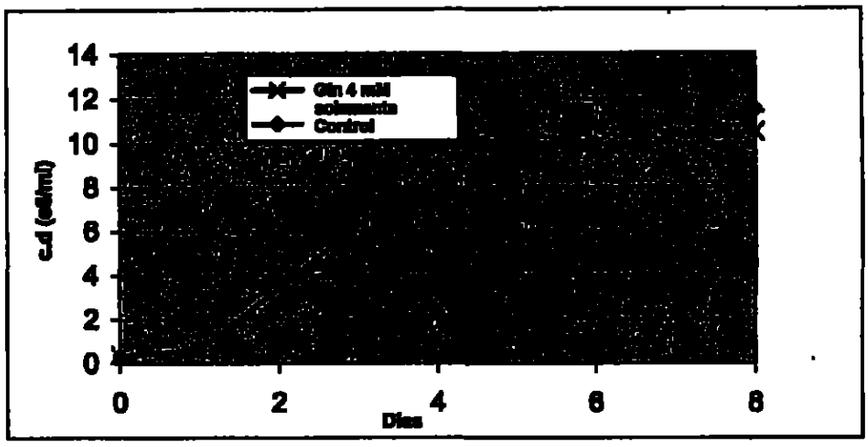


FIG. 9

Viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de alimentación carecientе de glutamina y de control

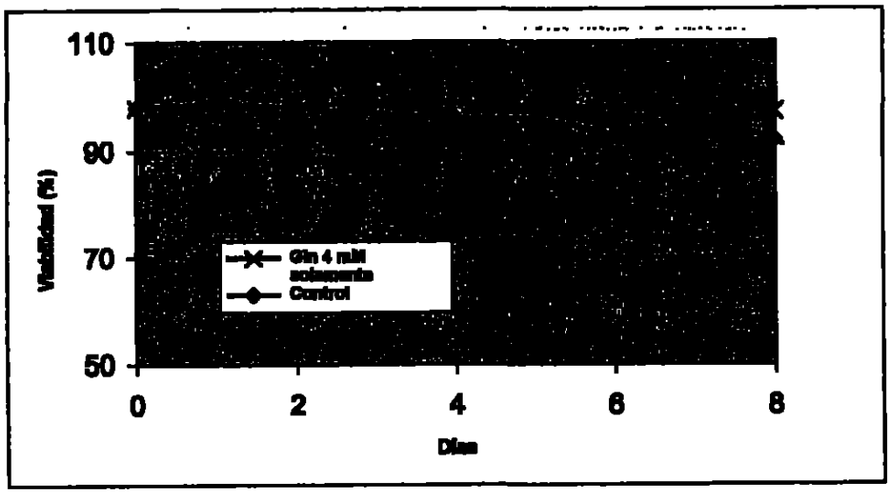


FIG. 10

Niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo carecientе de glutamina y de control

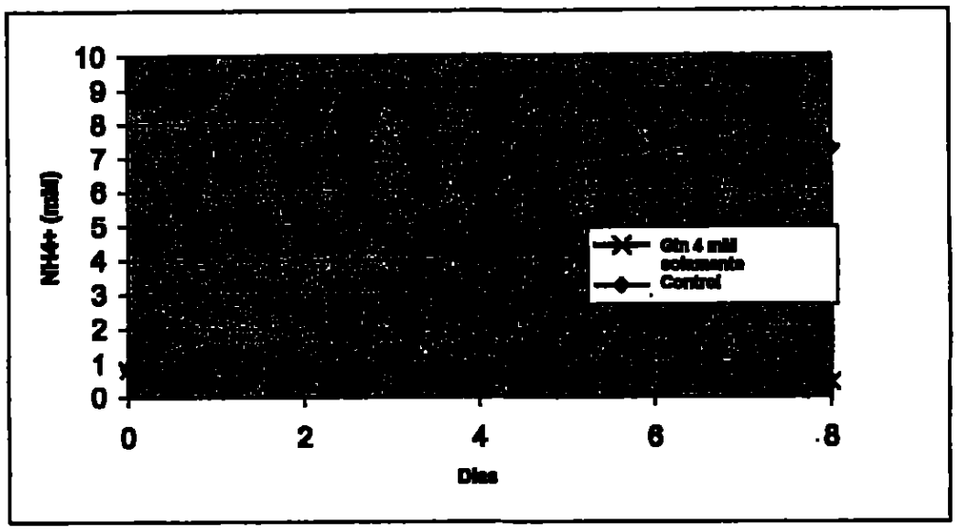


FIG. 11

Niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo carecientes de glutamina y de control

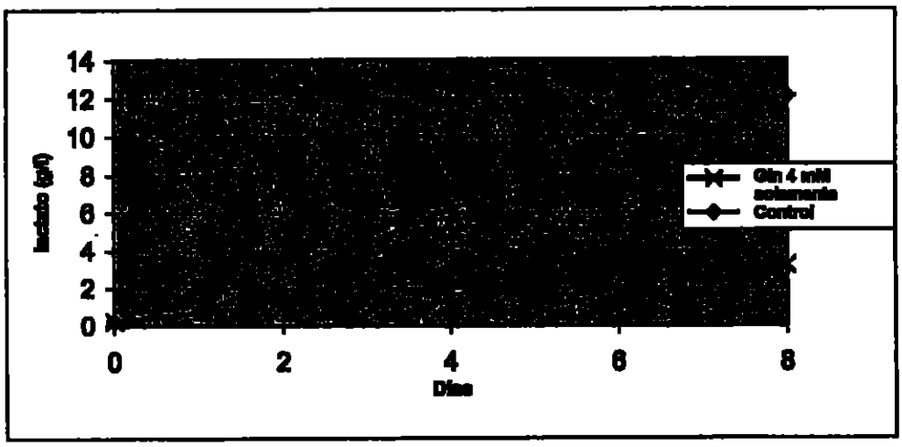


FIG. 12

Valoración anti-GDF-8 en condiciones de cultivo carecientes de glutamina y de control

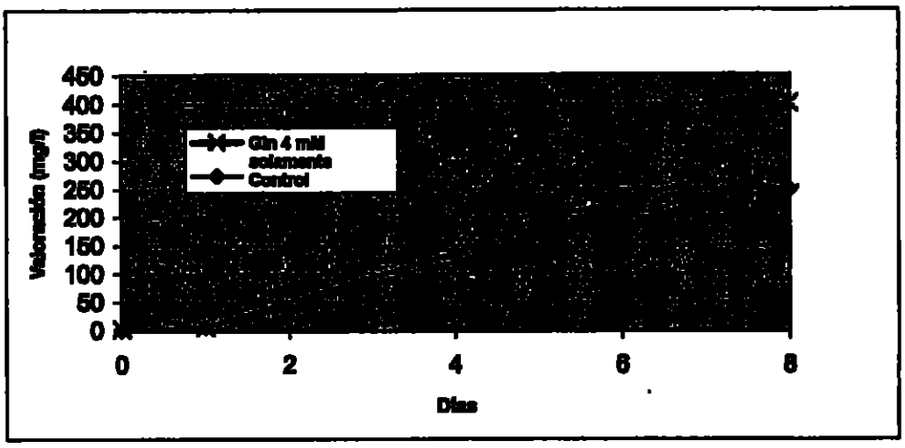


FIG. 13

Respuesta de dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2

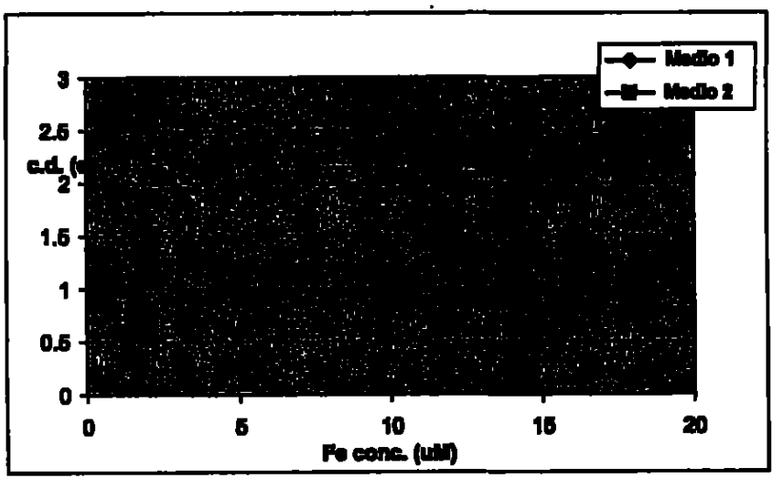


FIG. 14

Densidad celular de cultivos de alimentación de glutamato y glutamina

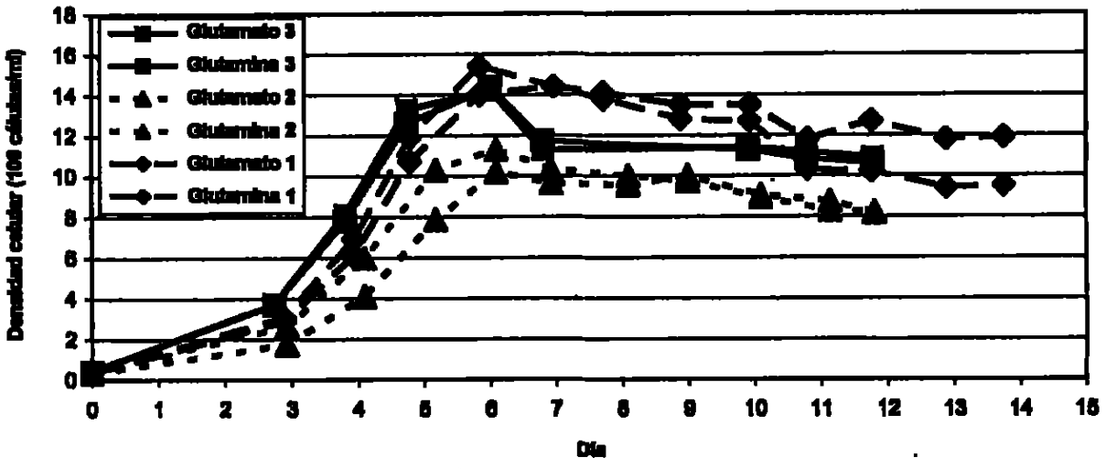


FIG. 15

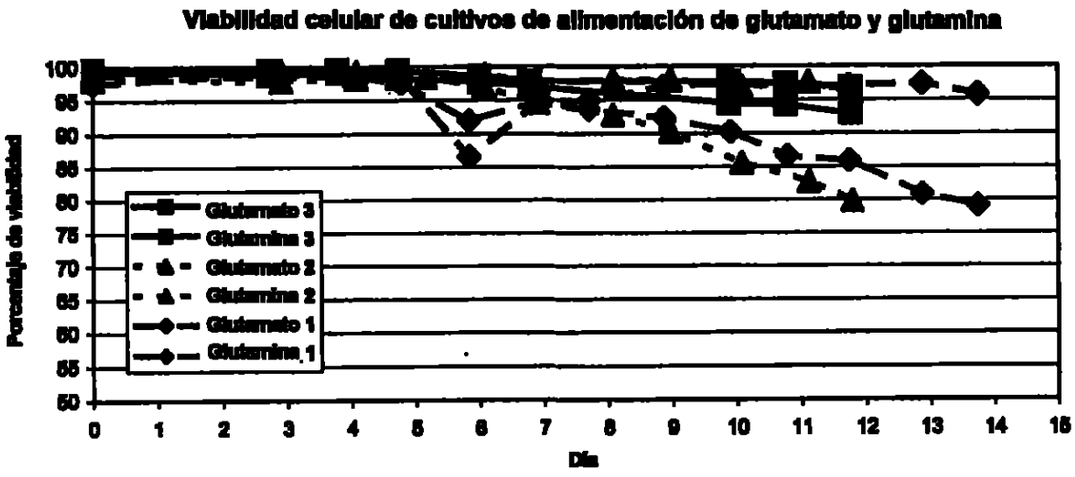

Viabilidad celular de cultivos de alimentación de glutamato y glutamina
Porcentaje de viabilidad
Día
Glutamato 3
Glutamina 3
Glutamato 2
Glutamina 2
Glutamato 1
Glutamina 1

FIG. 16

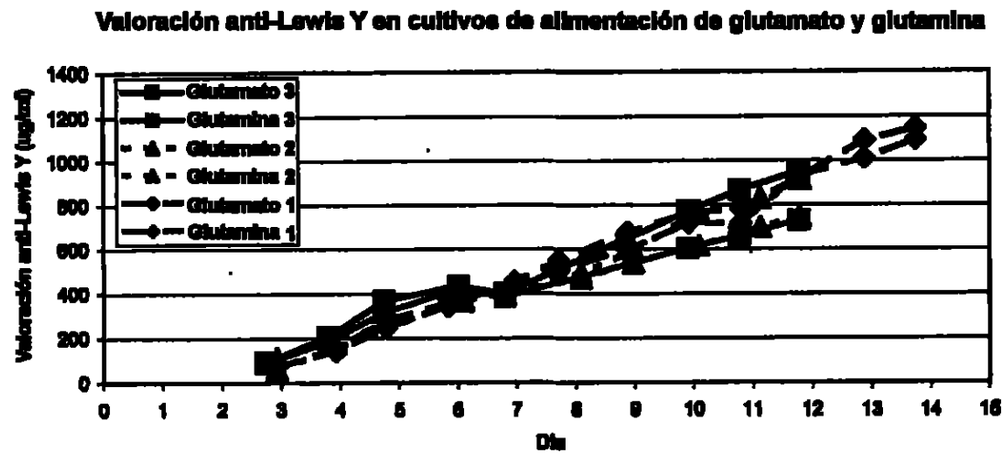

Valoración anti-Lewis Y en cultivos de alimentación de glutamato y glutamina
Valoración anti-Lewis Y (ug/ml)
Día
Glutamato 3
Glutamina 3
Glutamato 2
Glutamina 2
Glutamato 1
Glutamina 1

FIG. 17

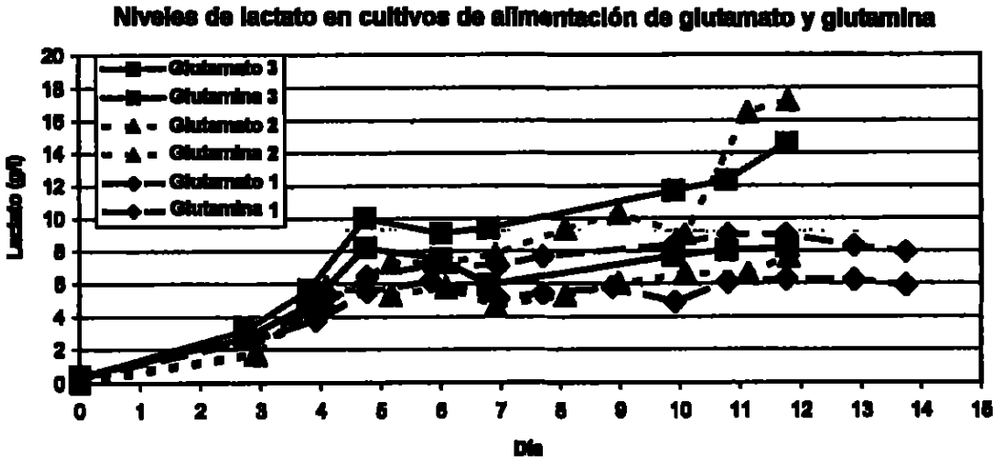


FIG. 18

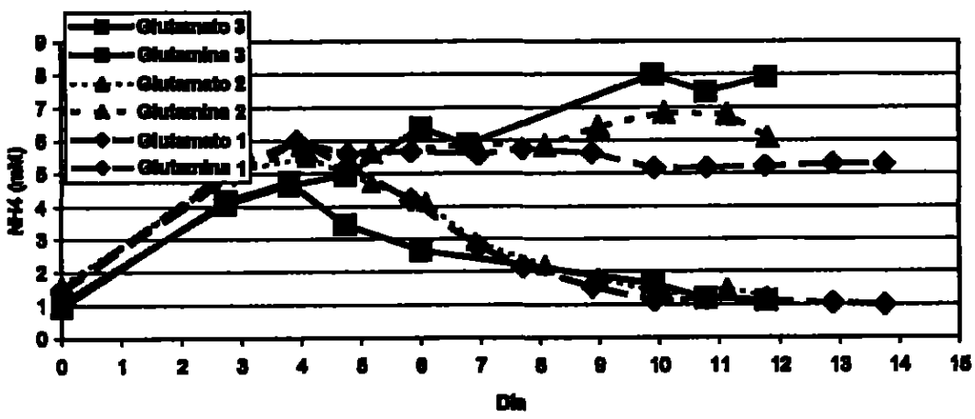


FIG. 19

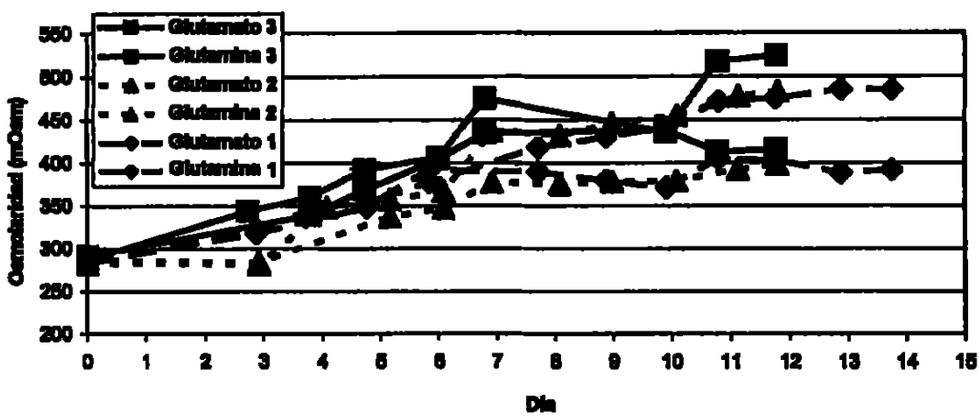


FIG. 20

Densidad celular. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones

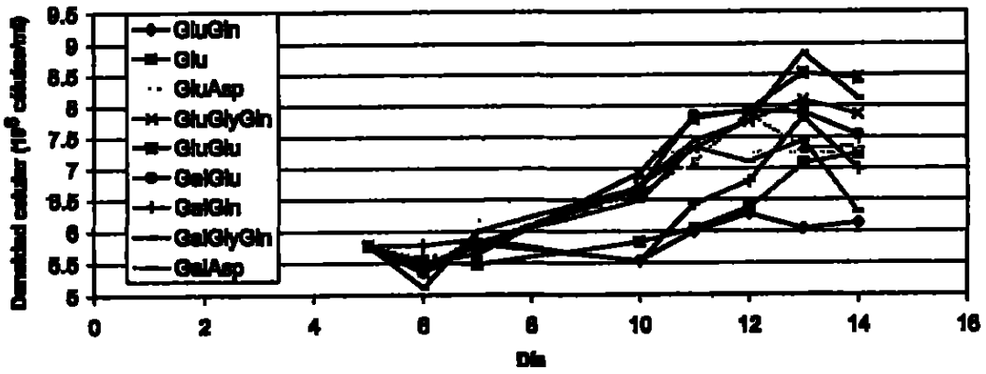


FIG. 21

Viabilidad celular. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones

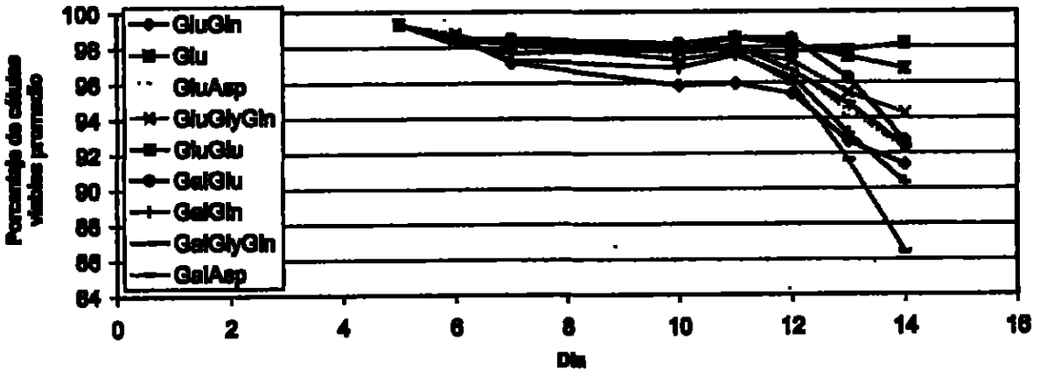
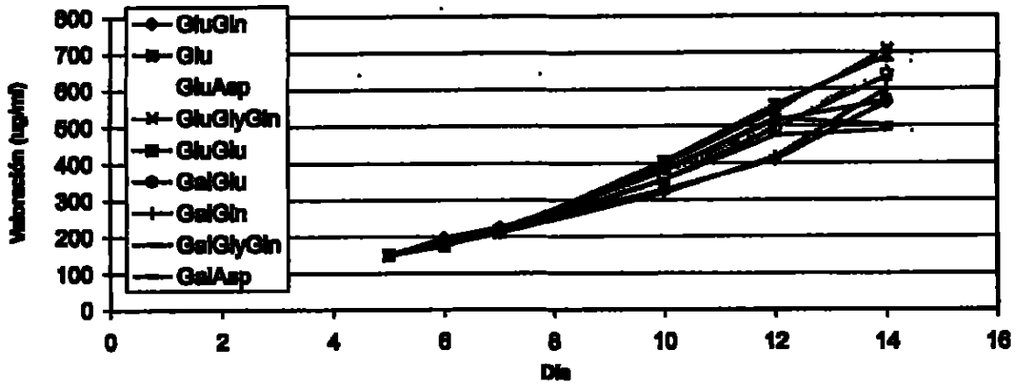


FIG. 22

Valoración promedio. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones



300

FIG. 23

Niveles de amonio. Cada diagrama es el promedio de dos frascos de agitación cultivados usando las mismas condiciones

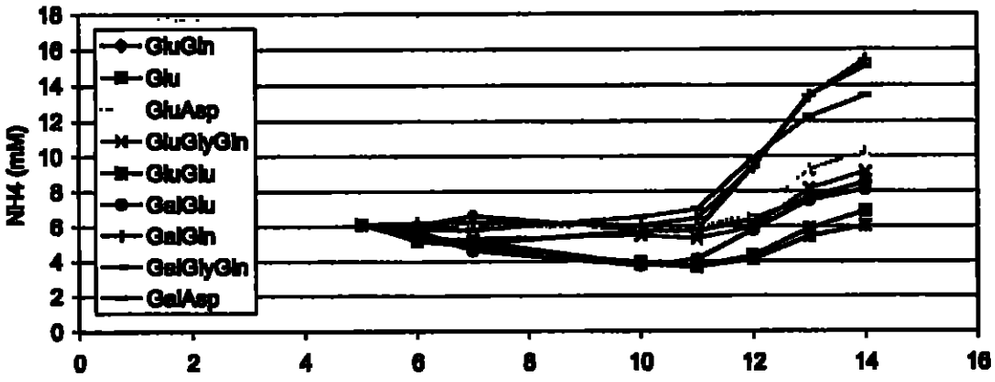


FIG. 24

Impulsor de salto

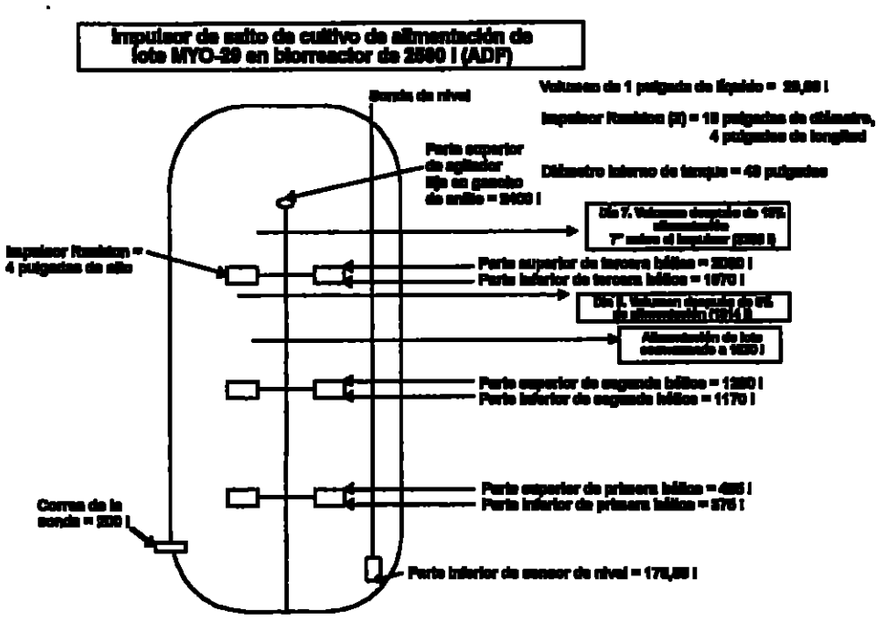


FIG. 25

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

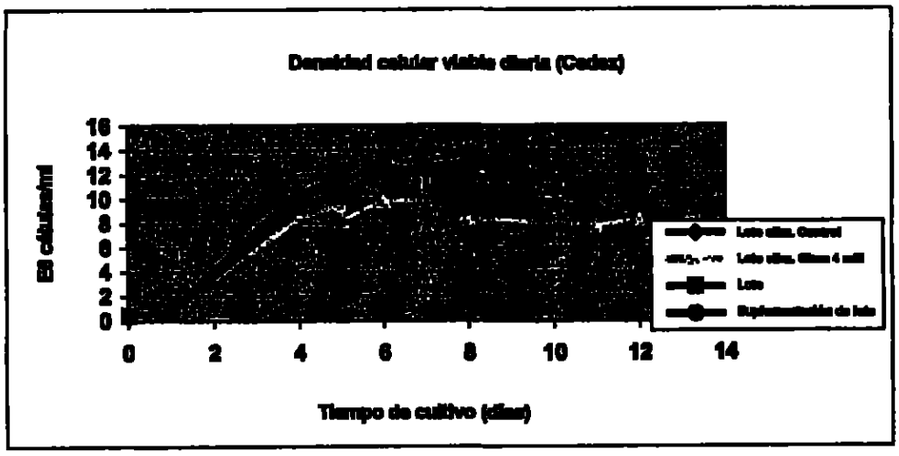


FIG. 26

Viabilidad de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

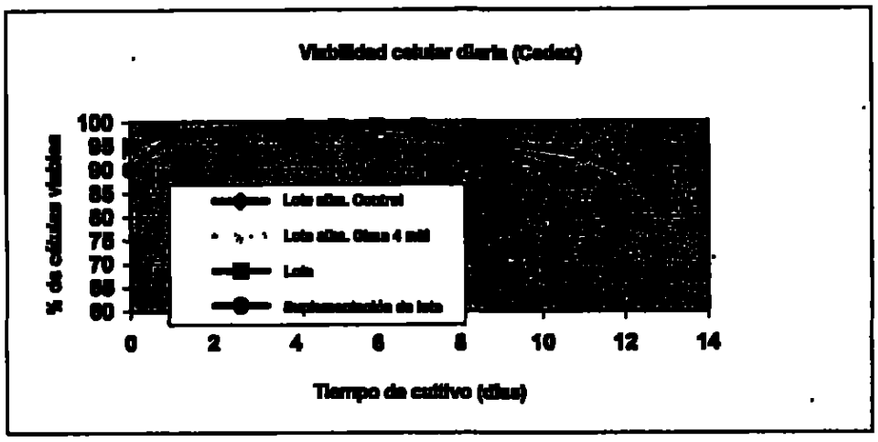


FIG. 27

Valoración anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

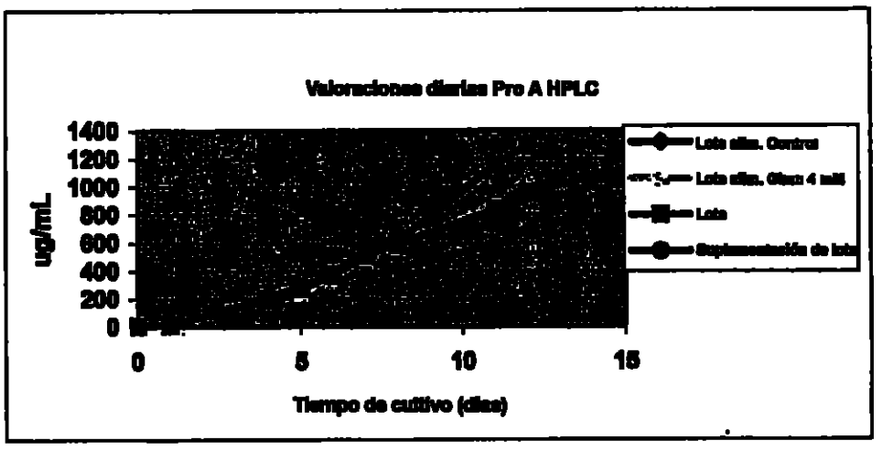


FIG. 28

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

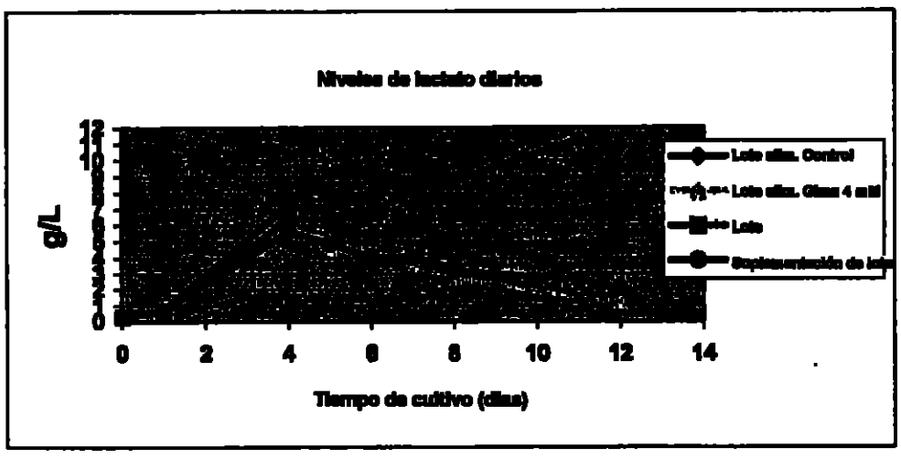


FIG. 29

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

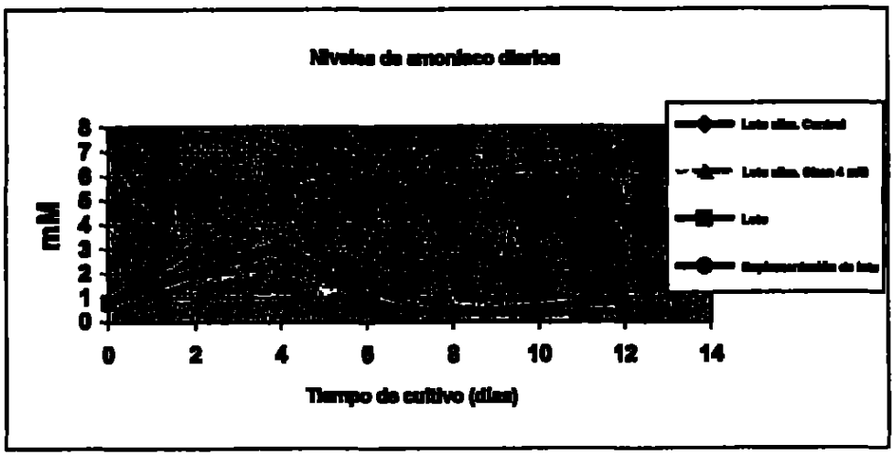


FIG. 30

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

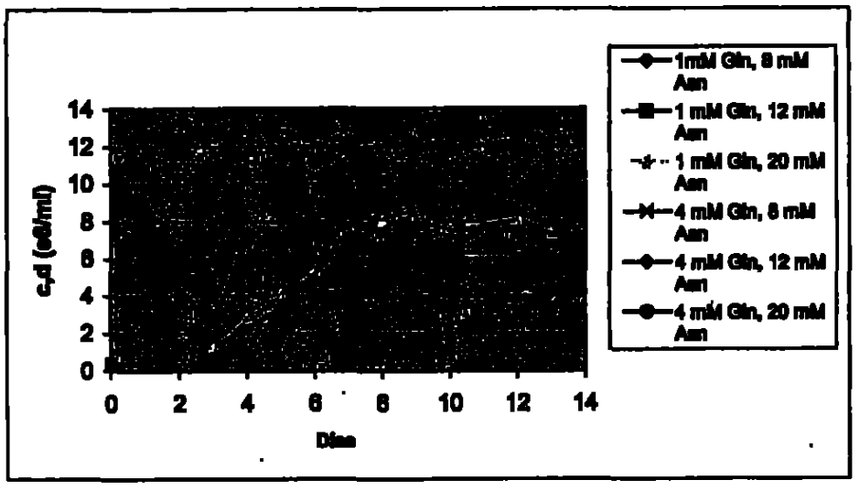


FIG. 31

Valoración anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

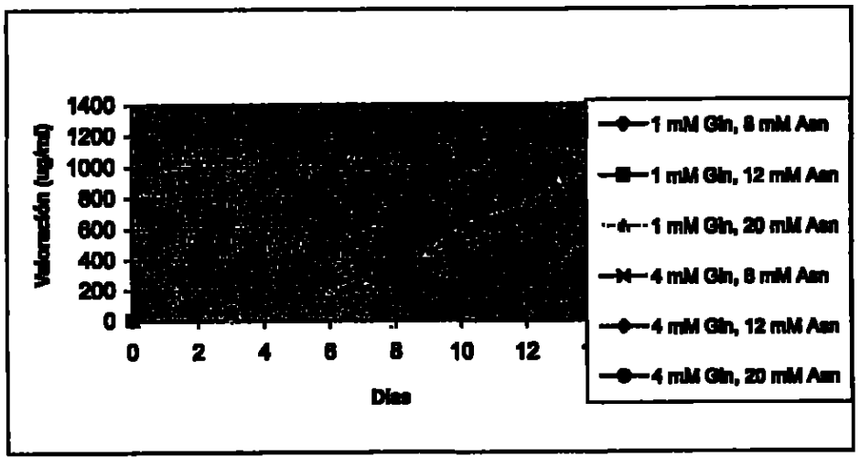


FIG. 32

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

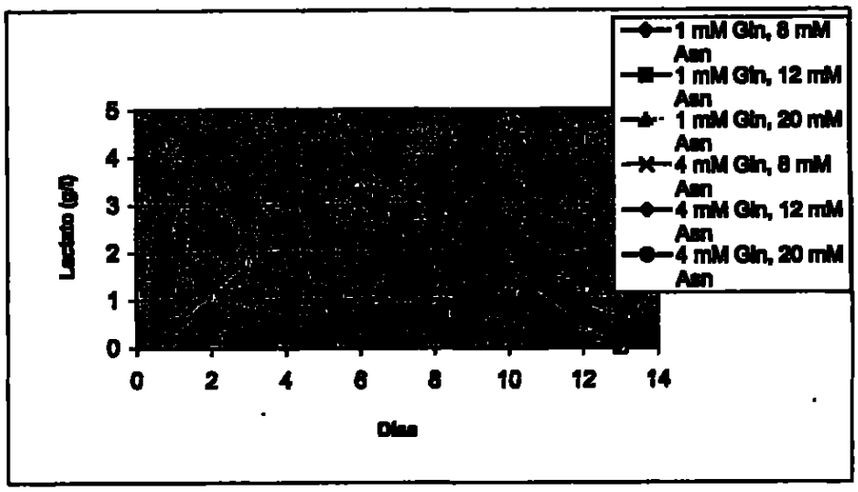


FIG. 33

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en varias condiciones experimentales

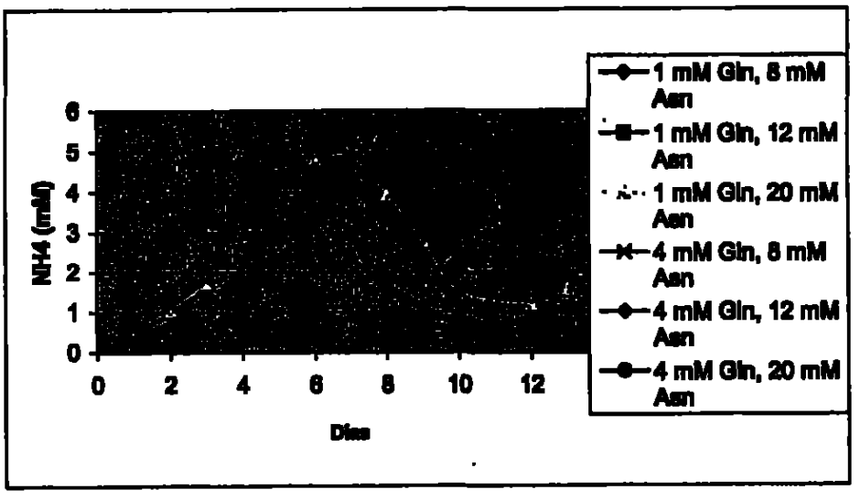


FIG. 34

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

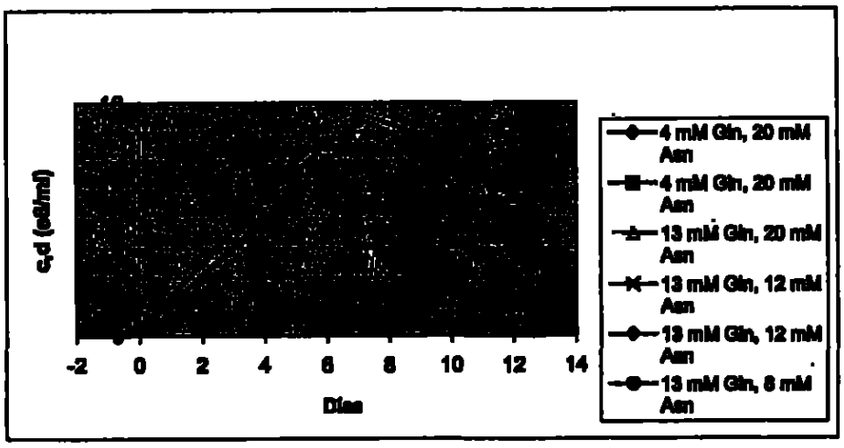


FIG. 35

Viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

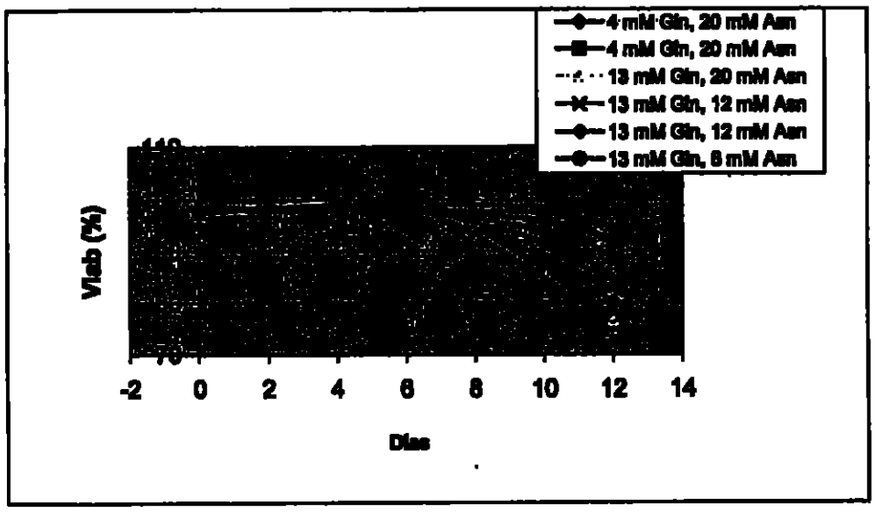


FIG. 36

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

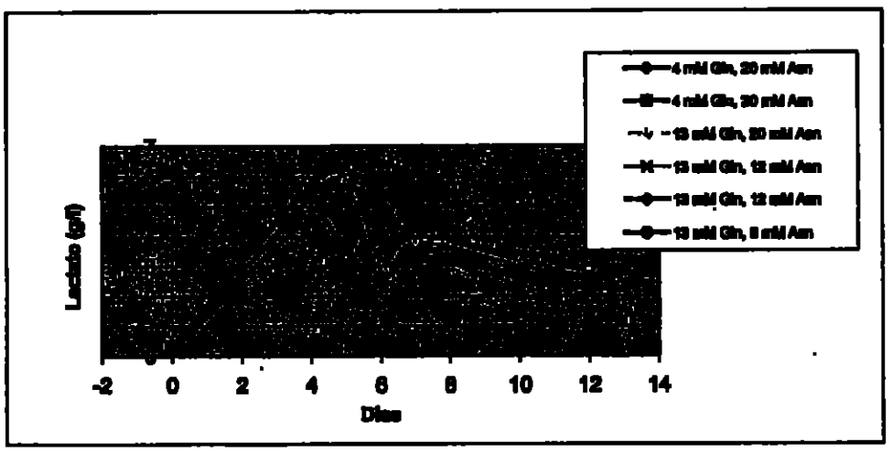


FIG. 37

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

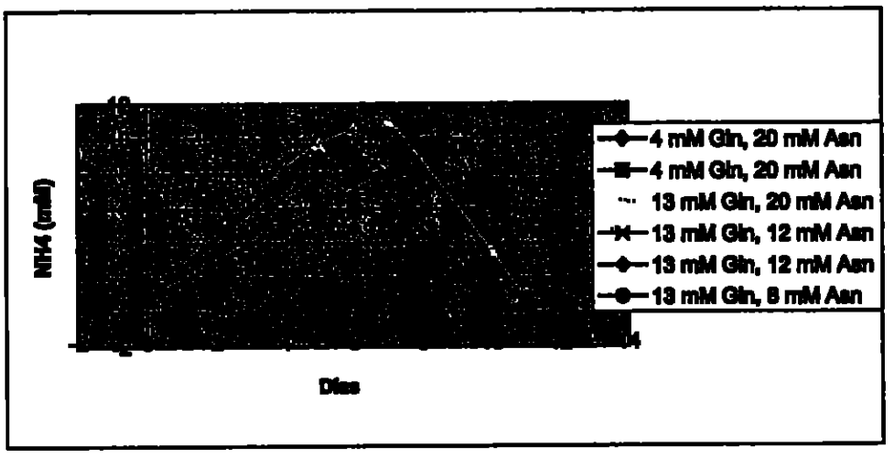


FIG. 38

Niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

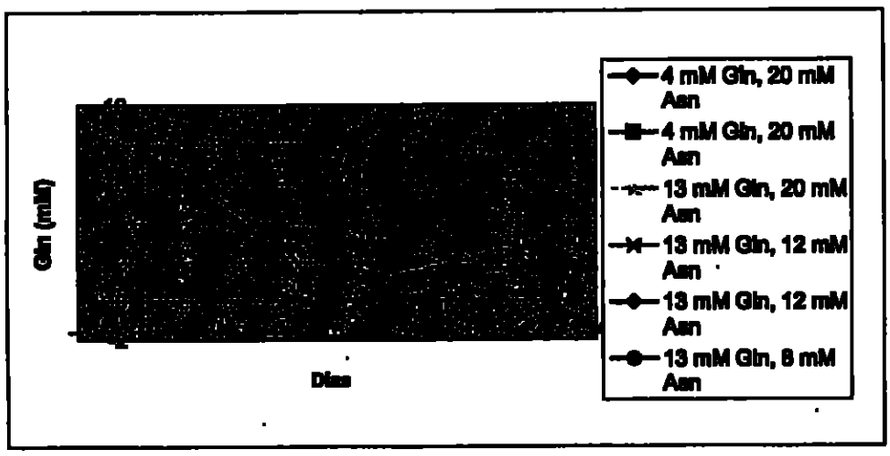


FIG. 39

Valoración anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

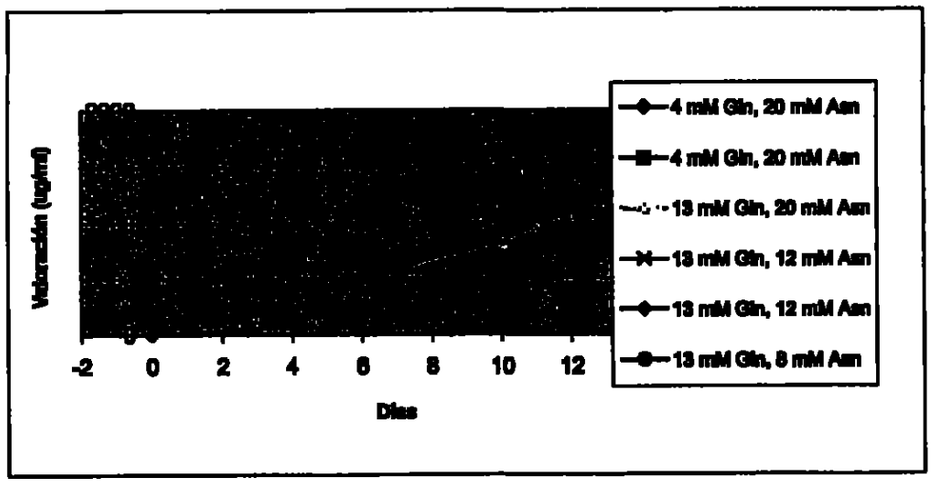


FIG. 40

Osmolaridad de cultivos anti-GDF-8 en Medio 9 modificado, que contiene varios niveles de glutamina y asparagina

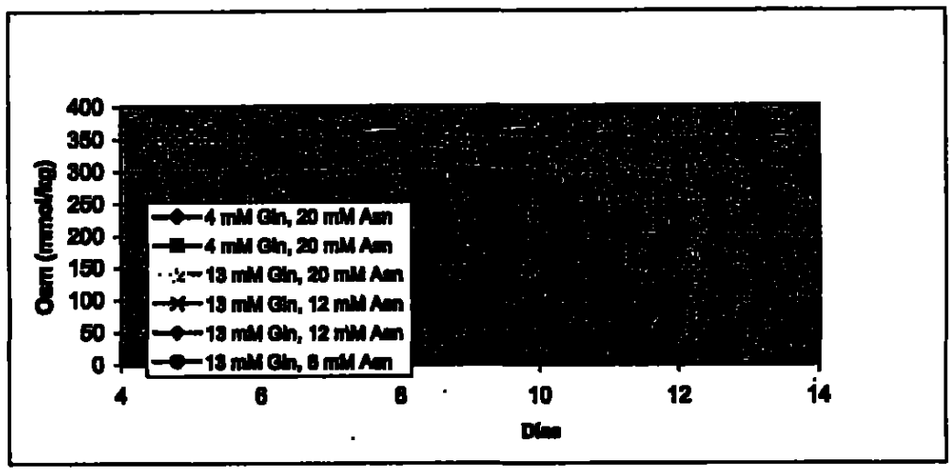


FIG. 41

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

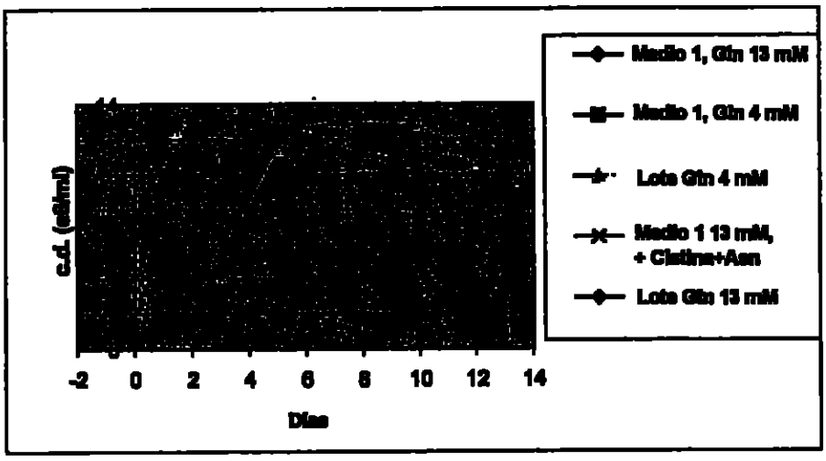


FIG. 42

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

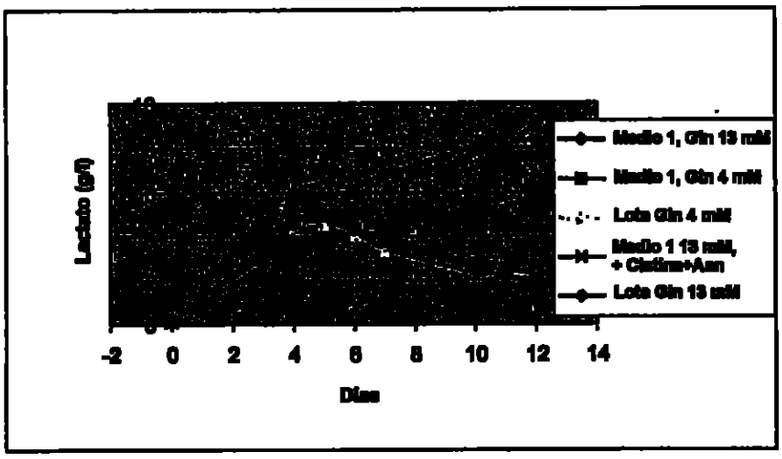


FIG. 43

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

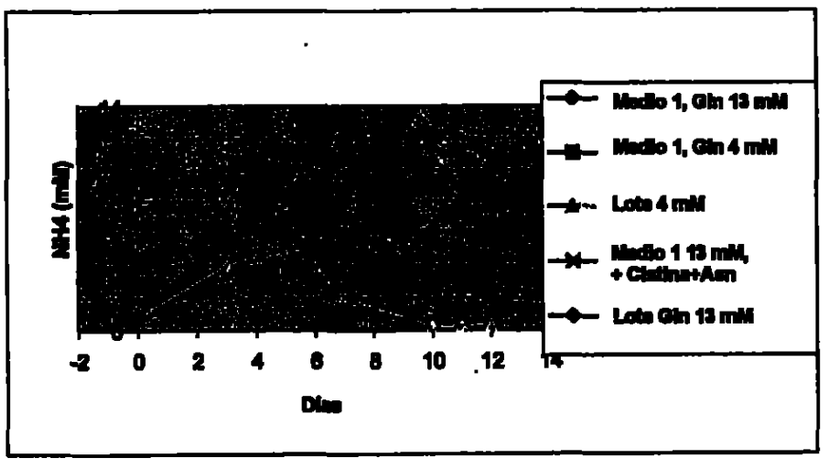


FIG. 44

Niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

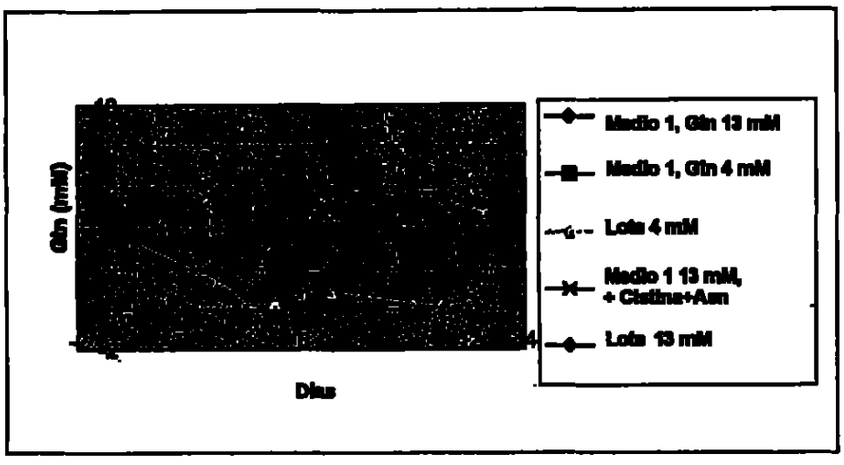


FIG. 45

Niveles de glutamato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

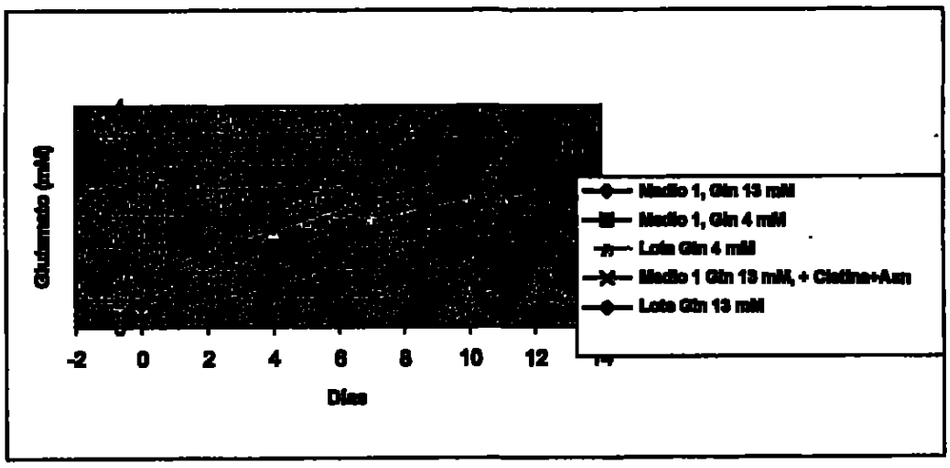


FIG. 46

Valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cisteína

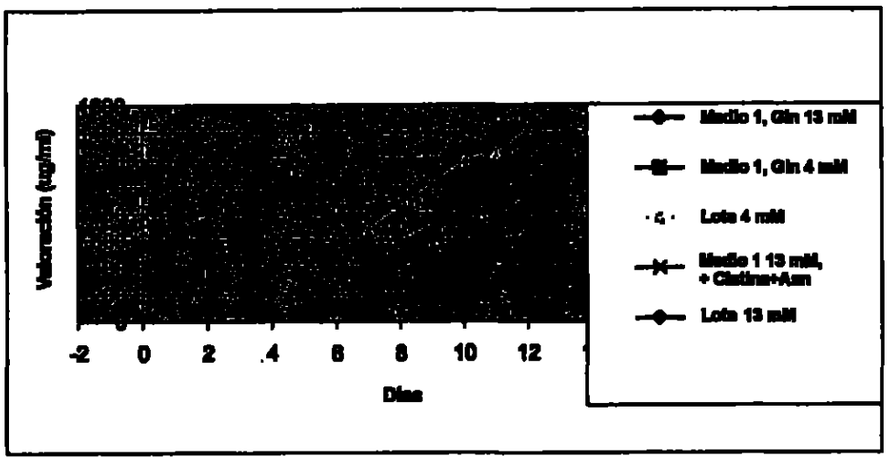


FIG. 47

Osmolaridad de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de asparagina y cistaína

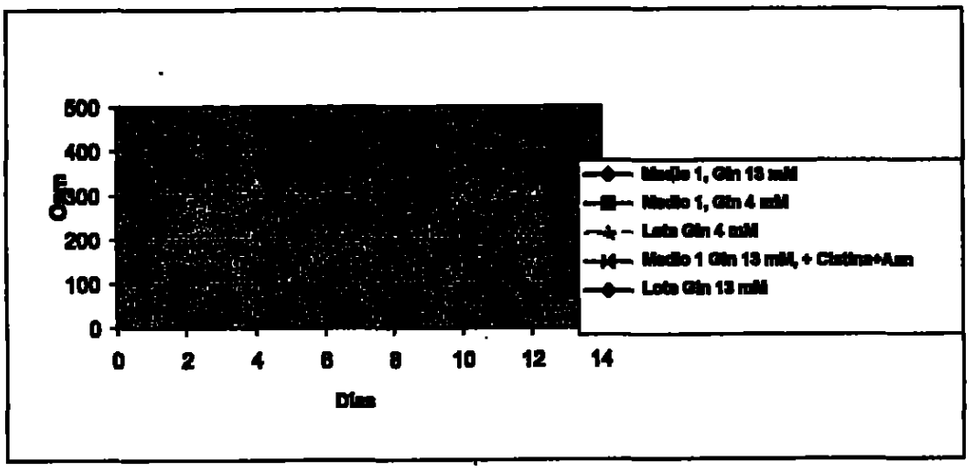


FIG. 48

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas

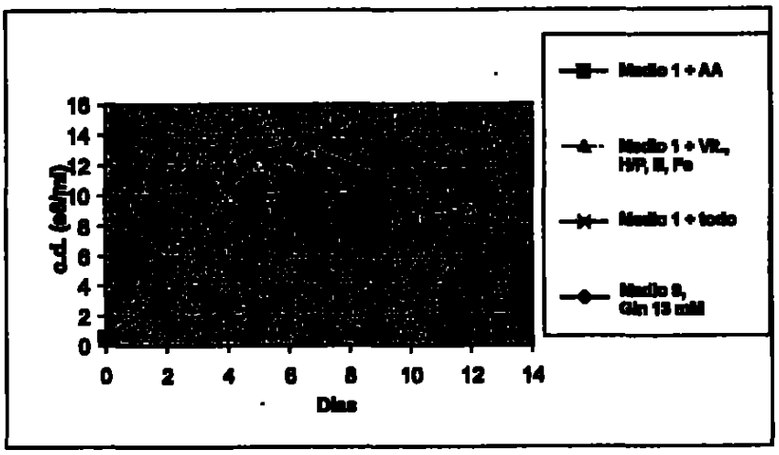


FIG. 49

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas

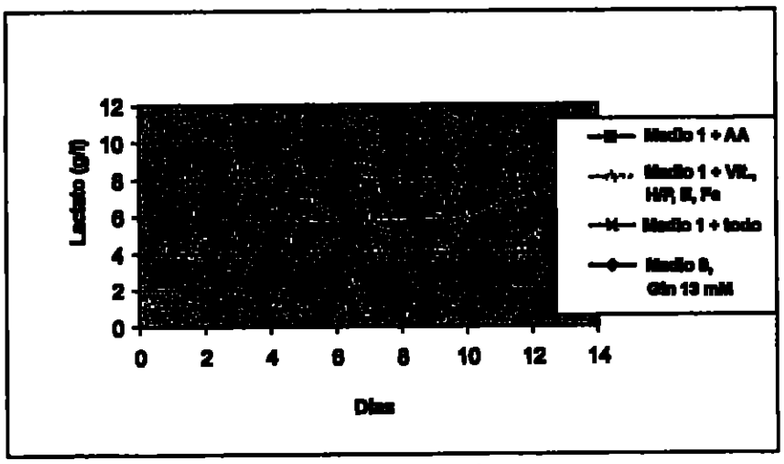


FIG. 50

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas

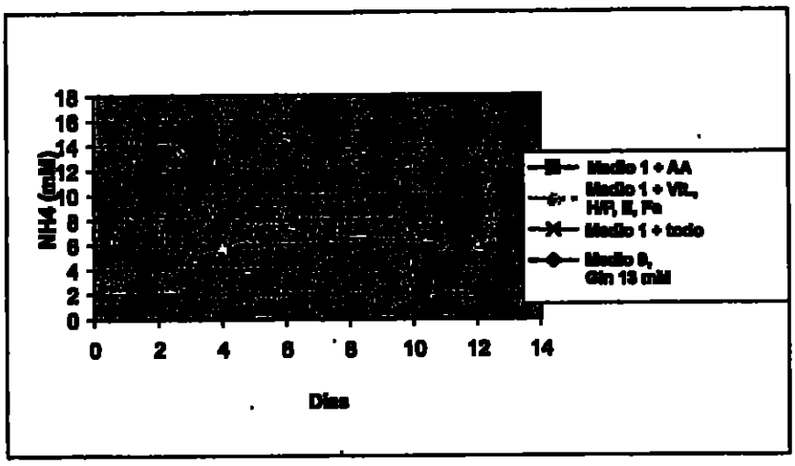


FIG. 51

Niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas

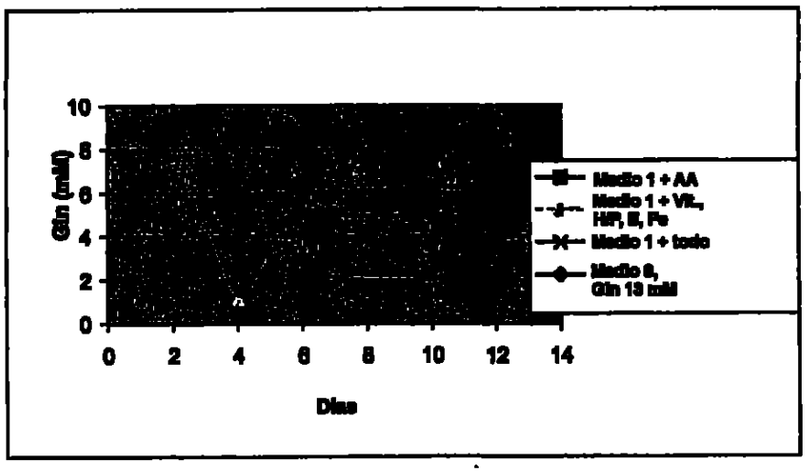


FIG. 52

Valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de aminoácidos y vitaminas

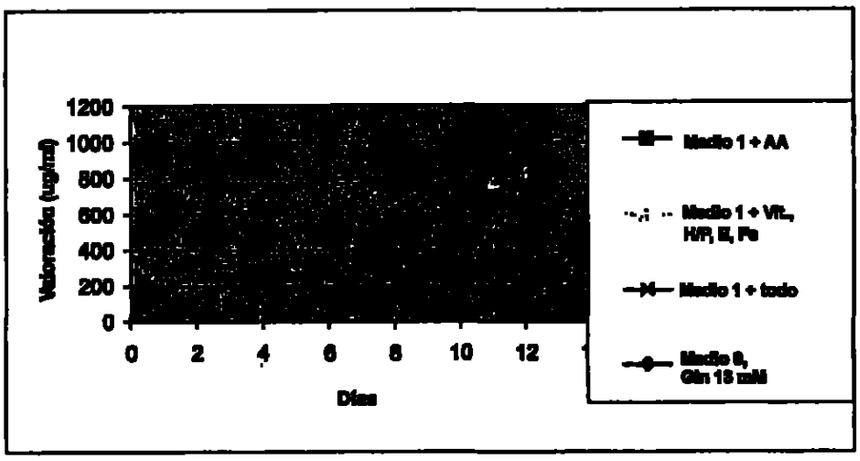


FIG. 53

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro

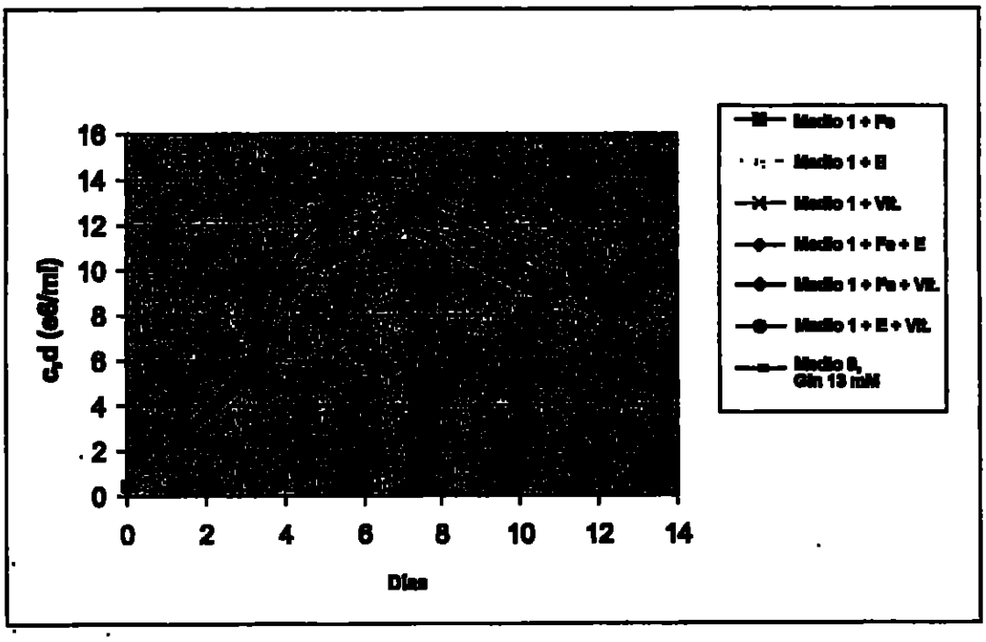


FIG. 54

Niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro

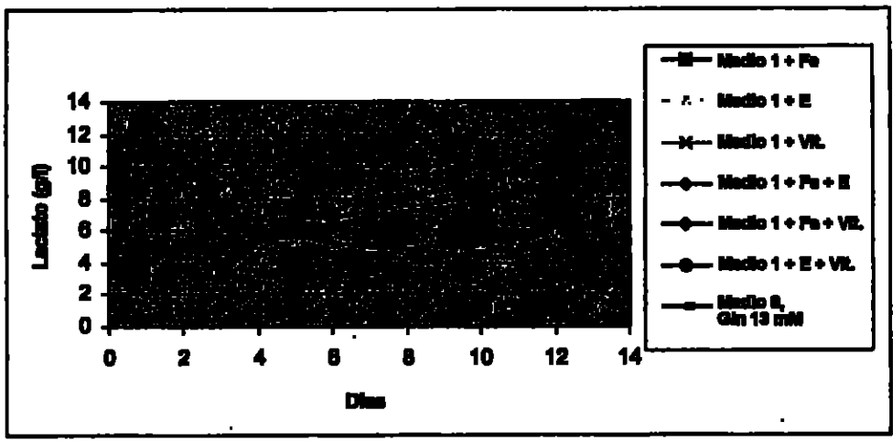


FIG. 55

Niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro

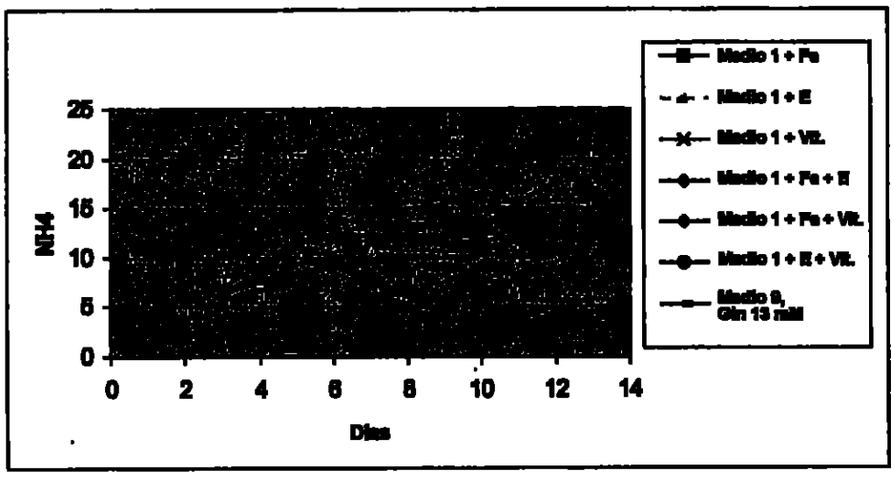


FIG. 56

Valoración anti-GDF-8 en medio que contiene varios niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro

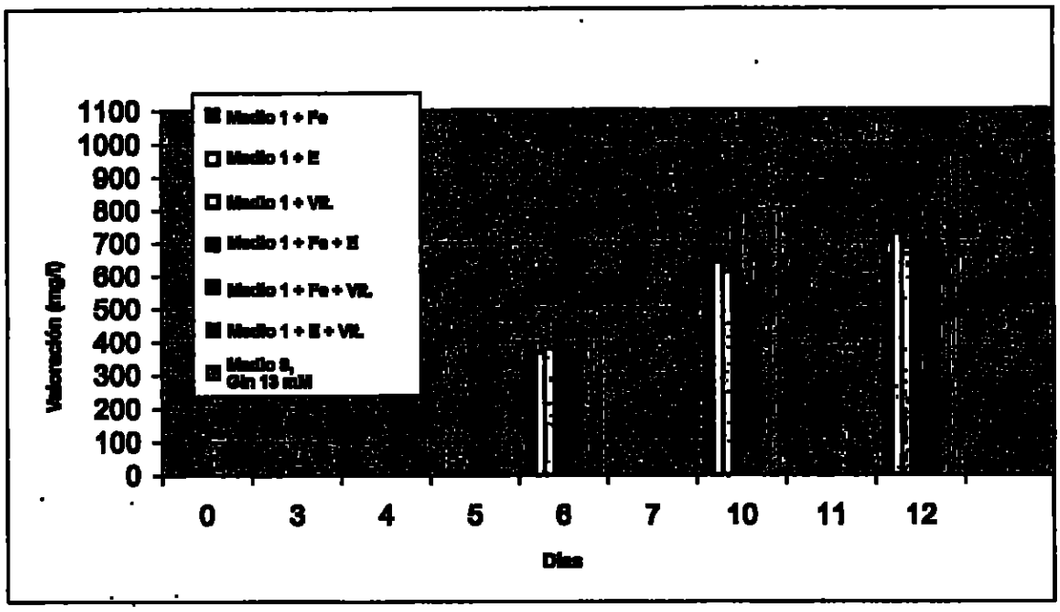


FIG. 57

Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en los Medios 1; 3 y 9

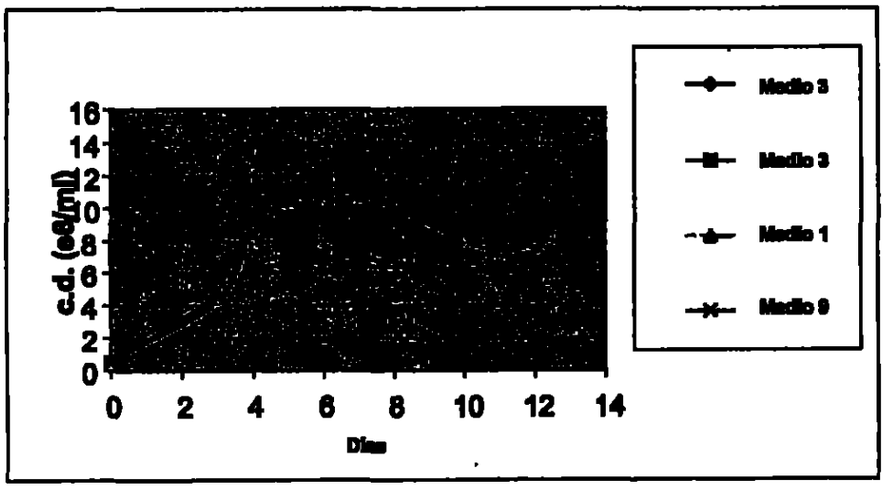


FIG. 58

Valoración anti-GDF-8 en los Medios 1; 3 y 9

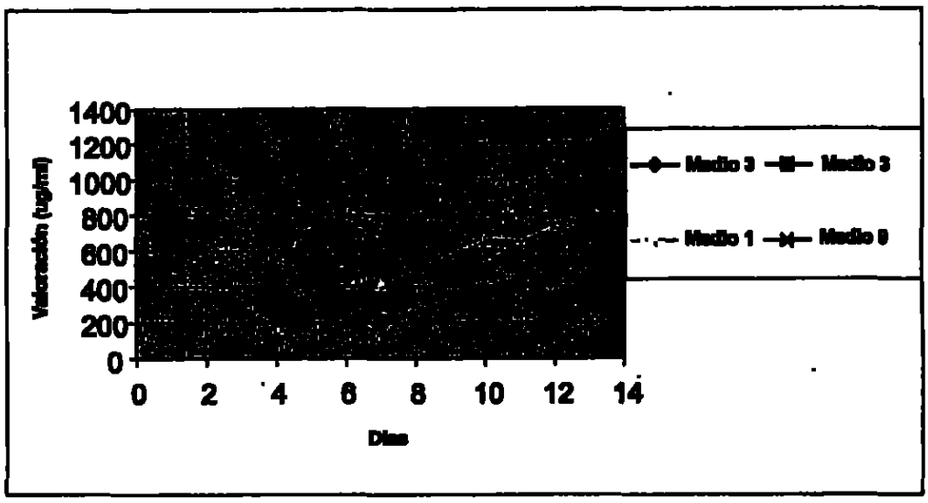


FIG. 59

Valoraciones anti-GDF-8 extrapoladas para varios niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina combinadas totales

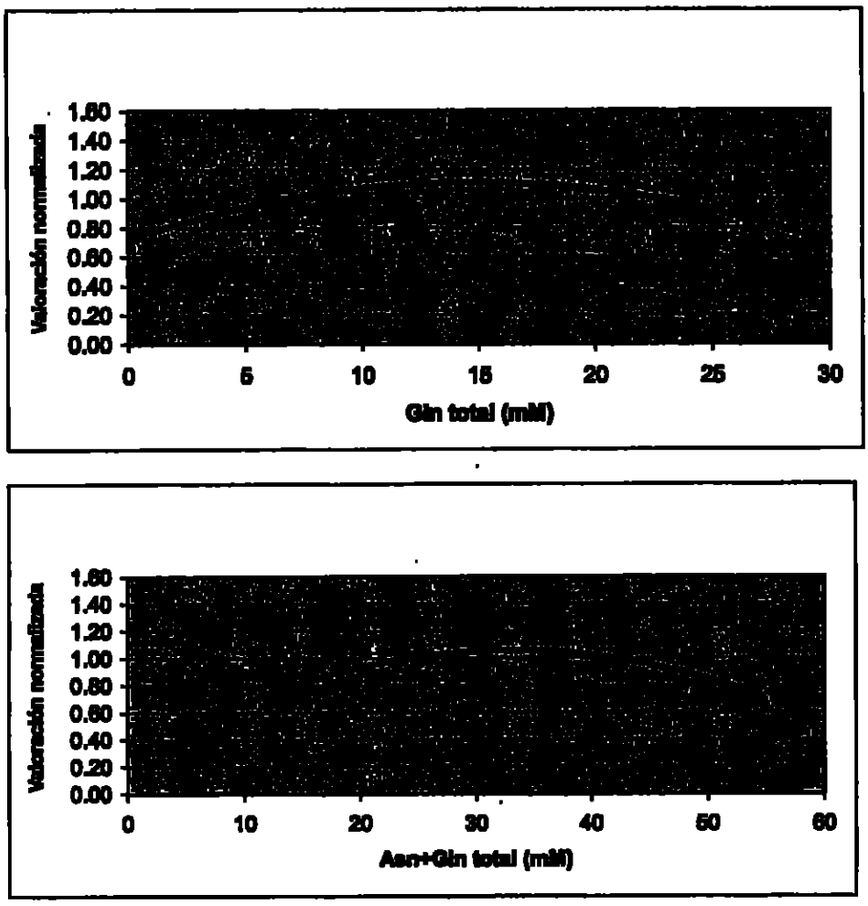


FIG. 60

Crecimiento de células anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

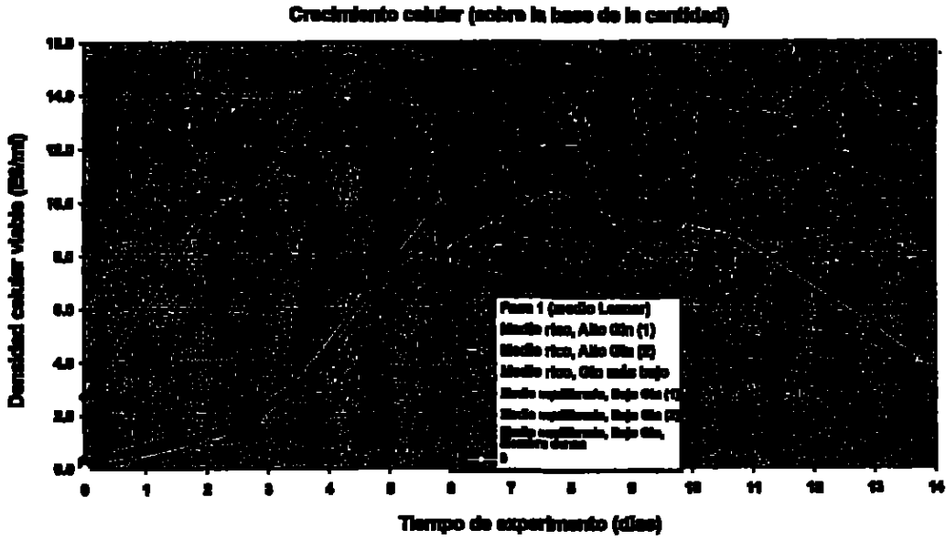


FIG. 61

Viabilidad de células anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

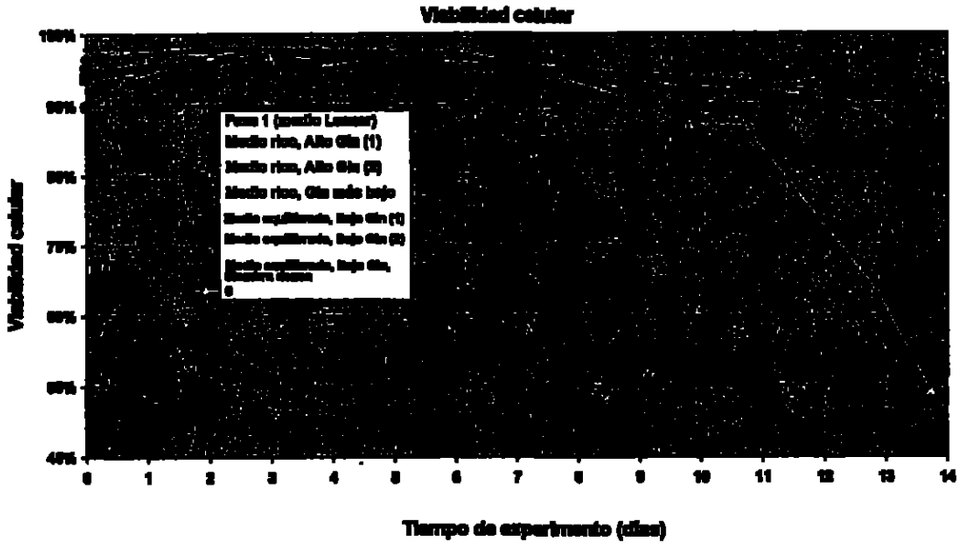


FIG. 62

Niveles de lactato de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

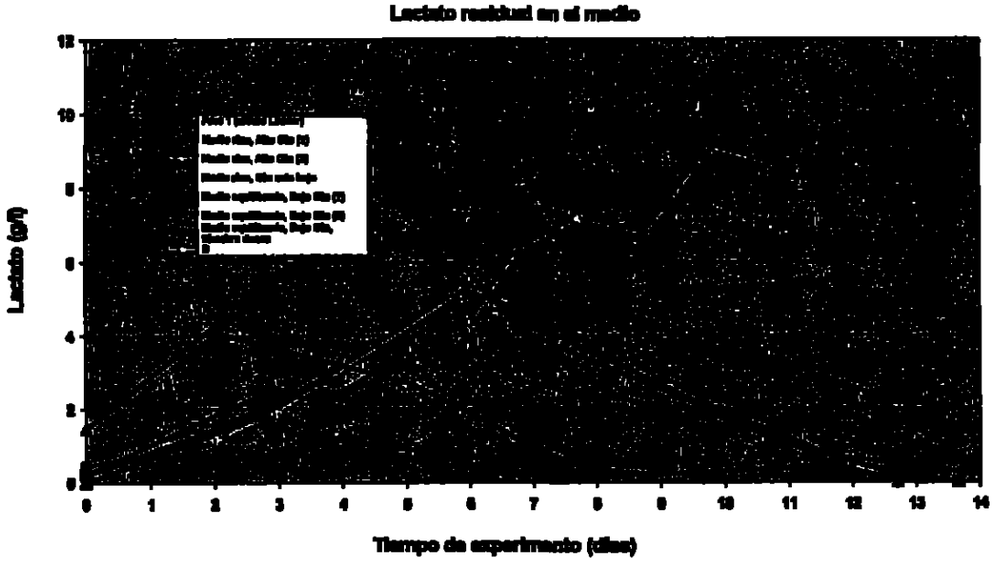


FIG. 63

Niveles de amonio de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

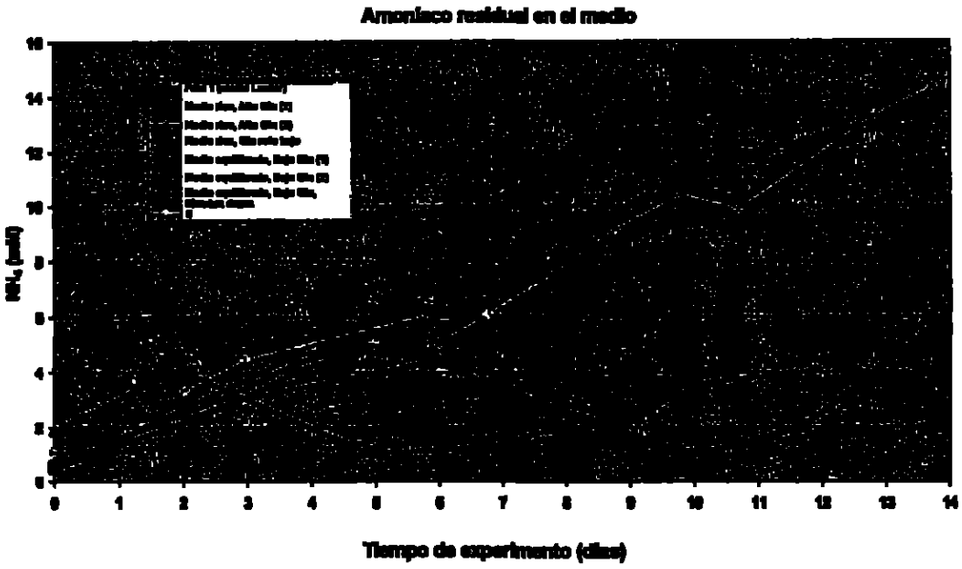


FIG. 64

Valoración de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

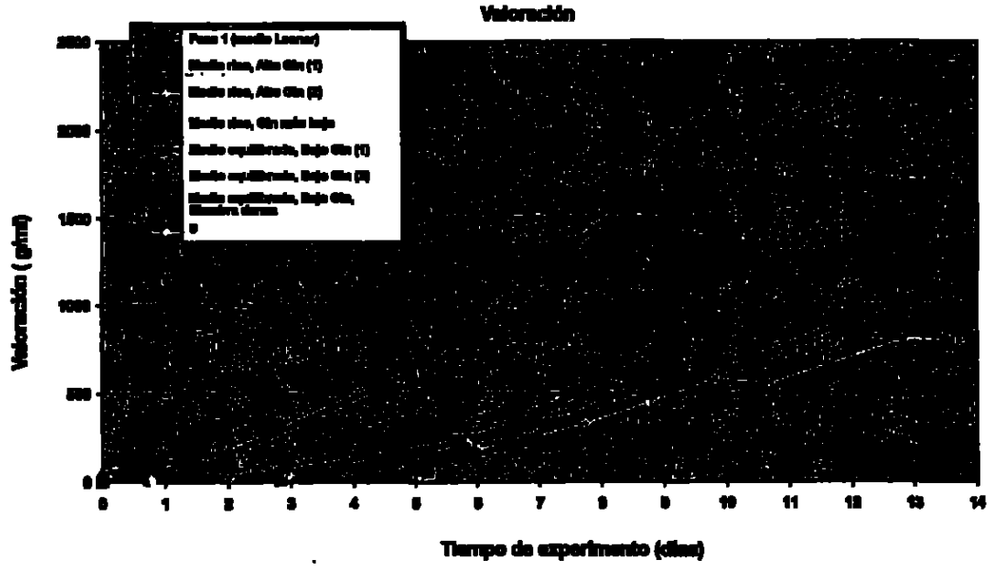


FIG. 65

Osmolaridad de cultivos de anti-ABeta en varias condiciones de medios evaluadas

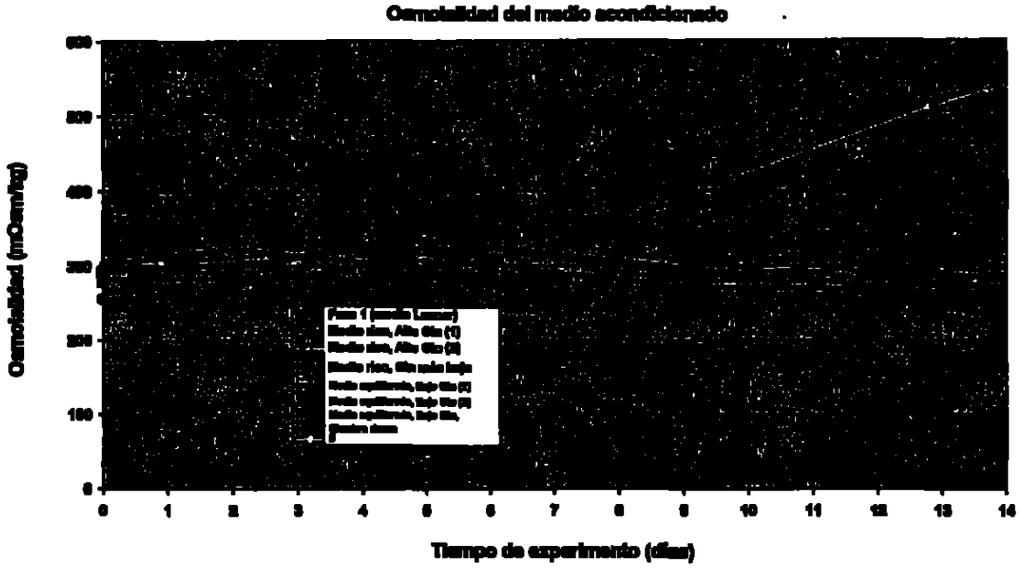


FIG. 66

Crecimiento de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

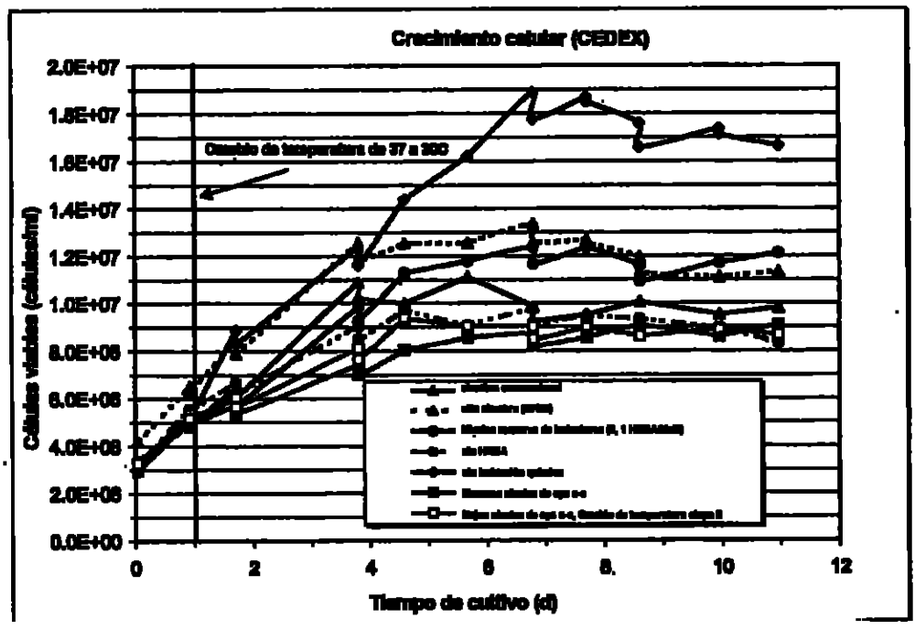


FIG. 67

Viabilidad de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

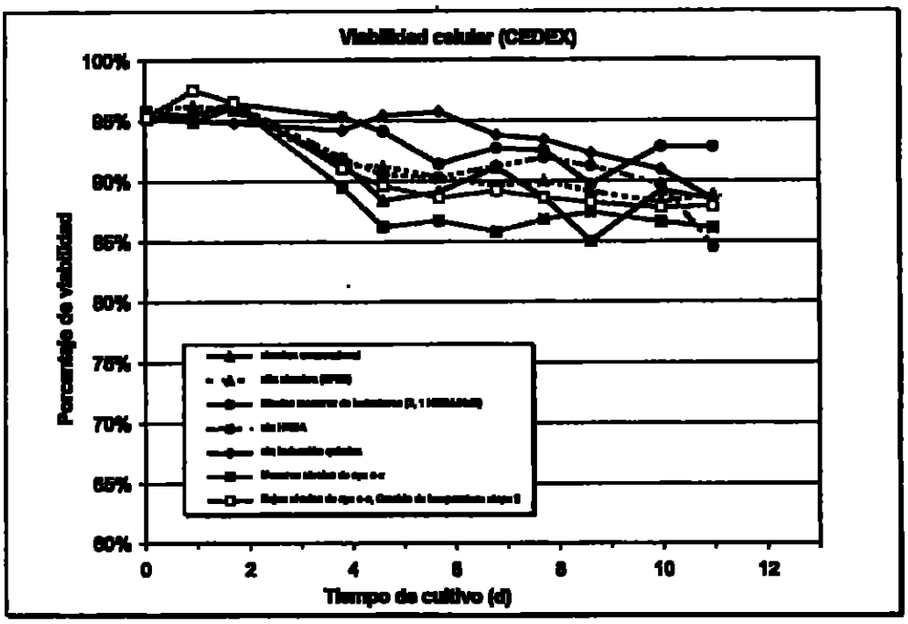


FIG. 68

Glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

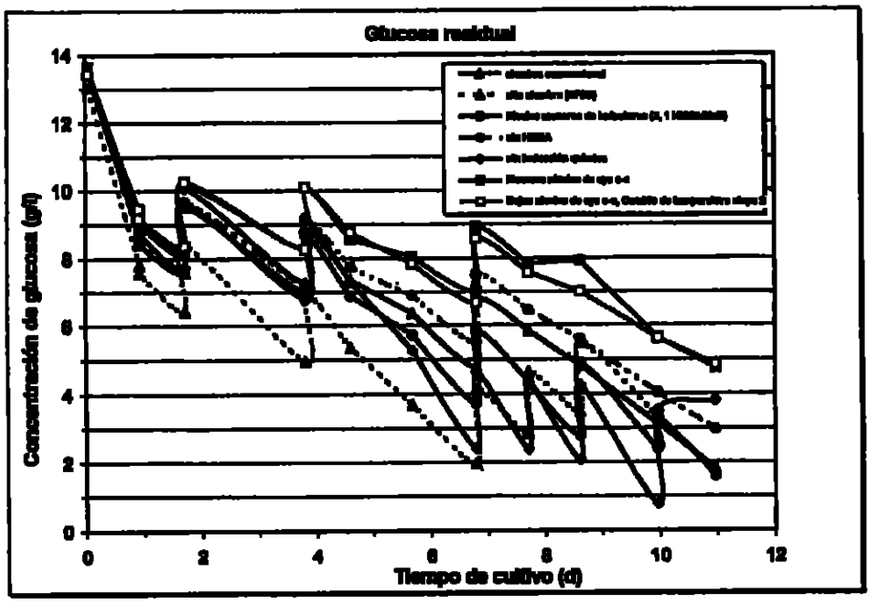


FIG. 69

Niveles de glutamina en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

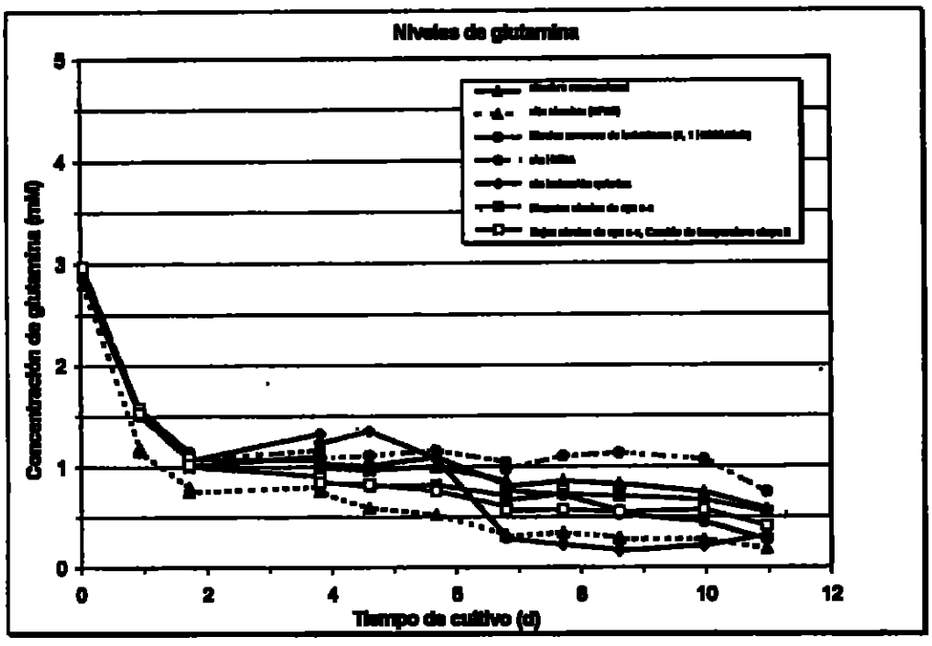


FIG. 70

Concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

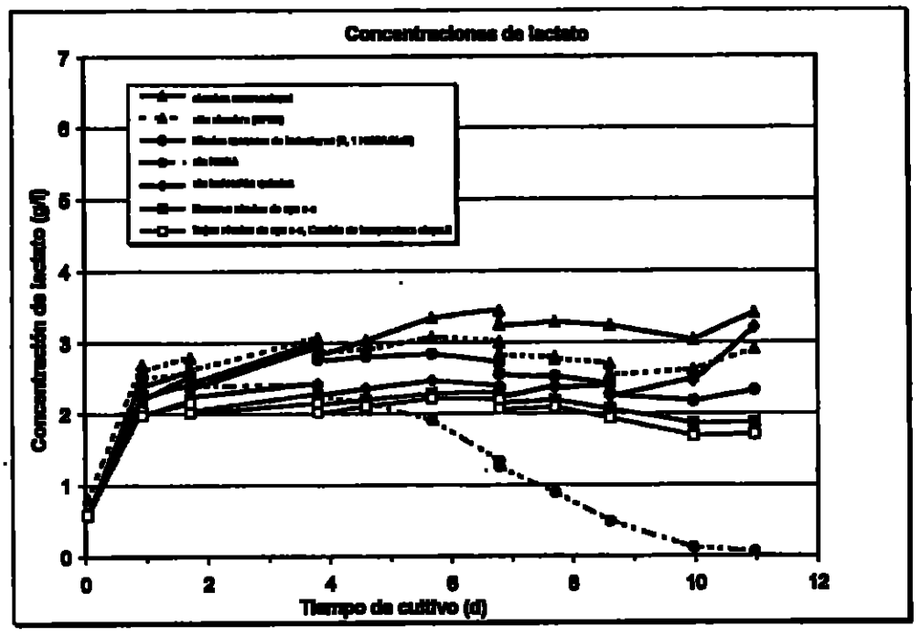


FIG. 71

Niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

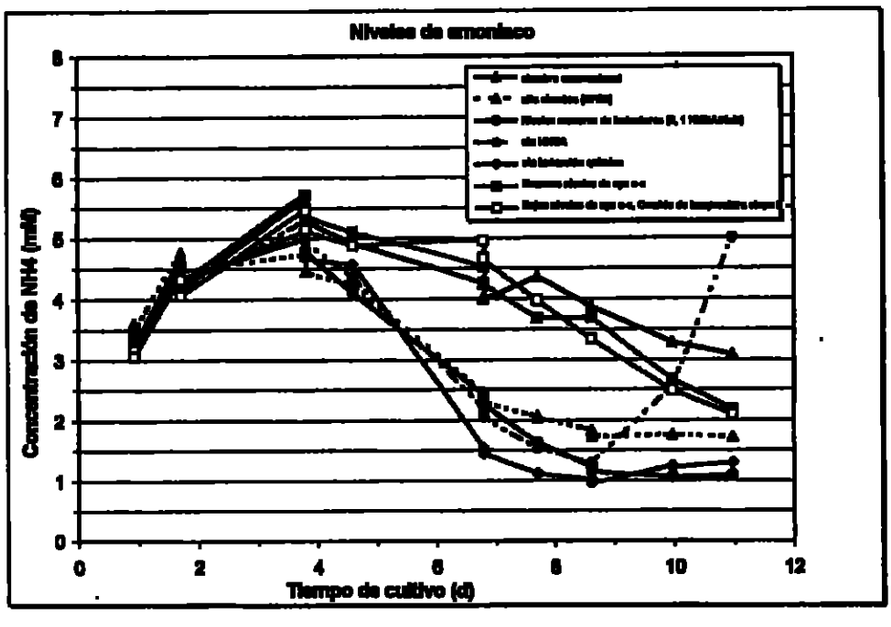


FIG. 72

Valoración relativa de TNFR-Ig en varias condiciones experimentales

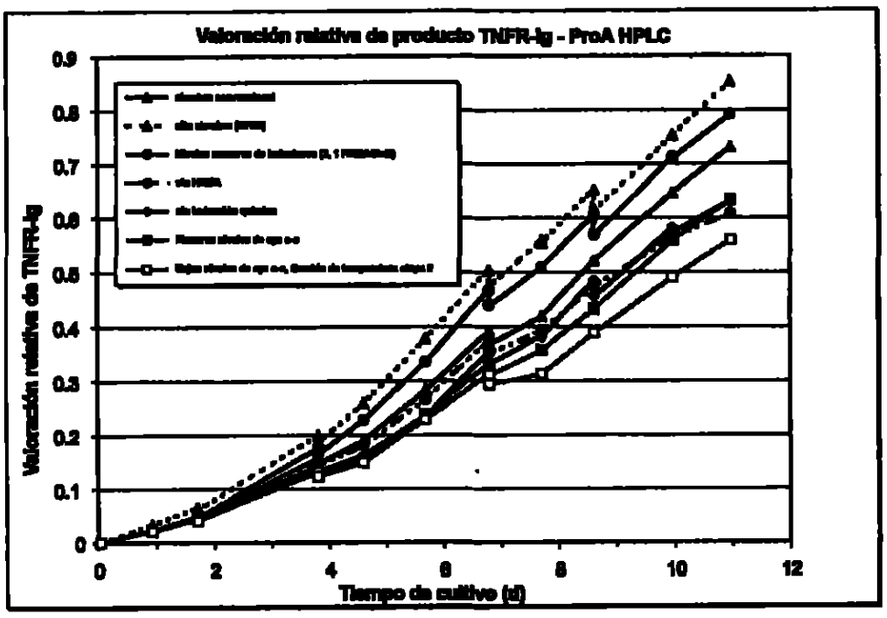


FIG. 73

Densidades celulares de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l

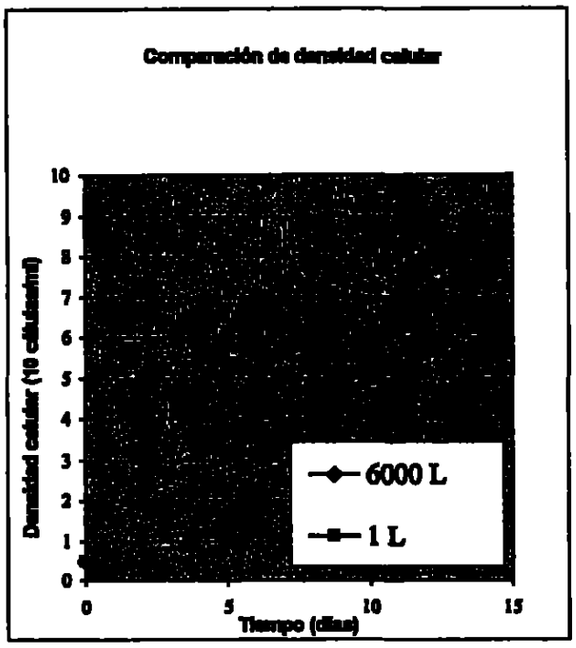


FIG. 74

Valoraciones de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l

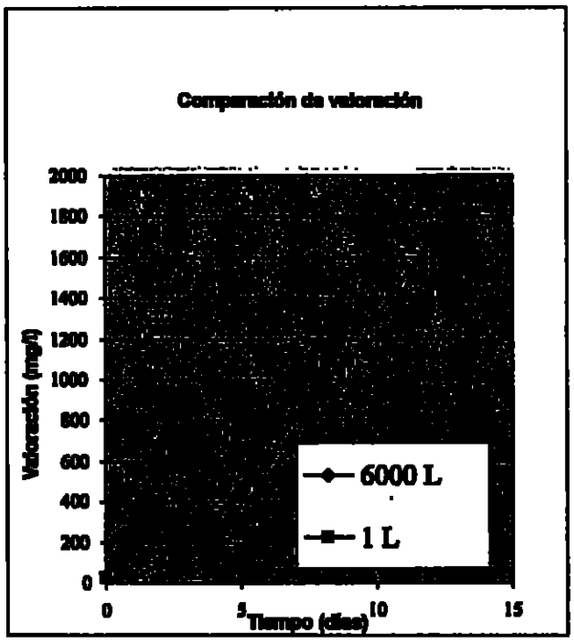


FIG. 75

Niveles de lactato de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l

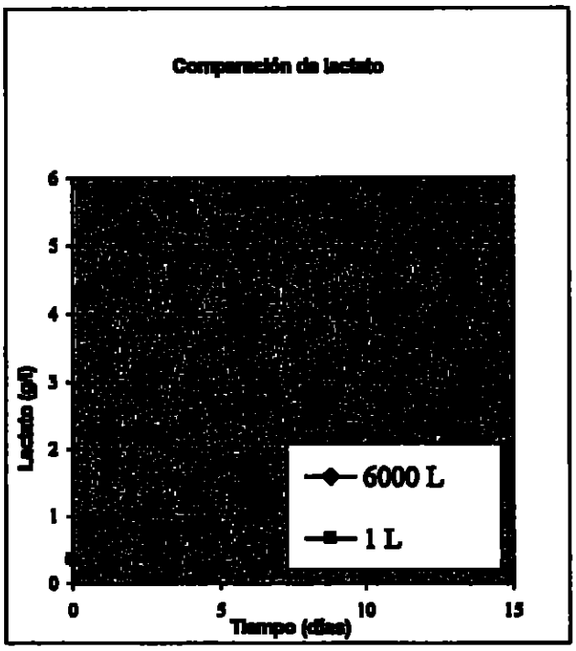
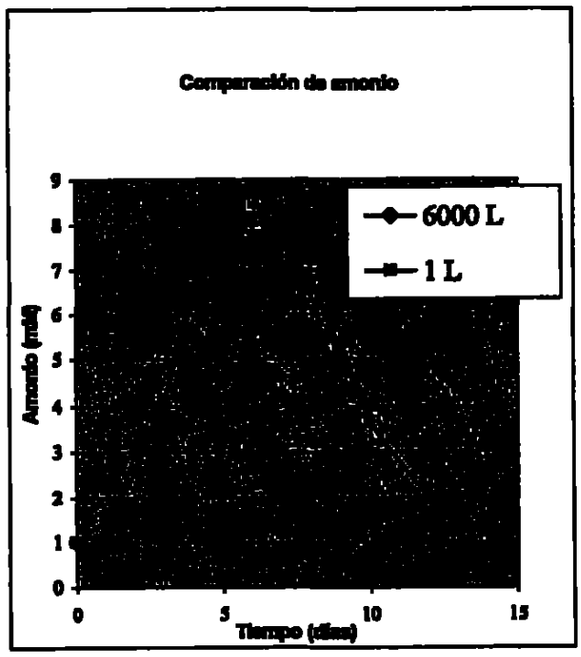


FIG. 76

Niveles de amonio de células anti-GDF8 cultivadas en biorreactores de 6000 l y 1 l



328

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No /US2005/030437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P21/02 C07K16/00 C12N5/00 C07K16/22 C07K16/30

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)
C12P C12N

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, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/101019 A (GENENTECH, INC; DELACRUZ, NESLIHAN; ETCHEVERRY, TINA; OSTLAND, MICHAEL) 19 December 2002 (2002-12-19) abstract; figure 2; tables 1,2 page 4, line 9 - line 16 page 4, line 31 - line 34 page 5, line 1 - line 3 page 5, line 22 - line 23 page 20, line 21 - line 31 page 25, line 12 page 27, line 3 - line 6 page 28, line 13 - line 14 page 29, line 21 - page 30, line 2 page 31, line 22 - line 24 page 36, line 25 - line 29 page 37, line 7 - line 9 page 43, line 8 - line 10 -/—	1-114

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in 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	Date of mailing of the international search report
11 January 2006	20/01/2006

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ceder, O

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/45411 A (QED BIOSCIENCE, INC; CHUA, FLORENCE; WENG, STEVE, OH, KAH) 15 October 1998 (1998-10-15) abstract; table 11	1-114
A	WO 93/05145 A (CELLTECH LIMITED) 18 March 1993 (1993-03-18) cited in the application abstract; table 1	1-114
A	US 2004/048368 A1 (CHEN MARY ET AL) 11 March 2004 (2004-03-11) abstract; table 4 paragraphs '0012!, '0018!, '0030!	
A	WO 03/027248 A (WYETH ET AL.) 3 April 2003 (2003-04-03) paragraph '0010!; claims 12,30,31 paragraph '0070!	109,111, 113
A	WO 95/24484 A (SCOTGEN BIOPHARMACEUTICALS, INC; LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH;) 14 September 1995 (1995-09-14) abstract; claims 9-11; figures	110,112, 114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

I Application No 00330
I/US2005/030437

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 02101019	A	19-12-2002	CA	2447791 A1	19-12-2002
			EP	1404813 A2	07-04-2004
			JP	2004532642 T	28-10-2004
WO 9845411	A	15-10-1998	CA	2286323 A1	15-10-1998
			EP	0973867 A1	26-01-2000
			JP	2002501374 T	15-01-2002
			US	2002012991 A1	31-01-2002
WO 9305145	A	18-03-1993	AT	168717 T	15-08-1998
			DE	69226350 D1	27-08-1998
			DE	69226350 T2	07-01-1999
			DK	555454 T3	26-10-1998
			EP	0555454 A1	18-08-1993
			ES	2118827 T3	01-10-1998
			JP	6502561 T	24-03-1994
			JP	3116066 B2	11-12-2000
US 2004048368	A1	11-03-2004	NONE		
WO 03027248	A	03-04-2003	CA	2469230 A1	03-04-2003
			EP	1438068 A2	21-07-2004
			JP	2005510212 T	21-04-2005
WO 9524484	A	14-09-1995	AT	242326 T	15-06-2003
			AU	696286 B2	03-09-1998
			AU	1990795 A	25-09-1995
			CA	2185114 A1	14-09-1995
			DE	69530975 D1	10-07-2003
			DE	69530975 T2	19-05-2004
			DK	749482 T3	29-09-2003
			EP	0749482 A1	27-12-1996
			ES	2199985 T3	01-03-2004
			PT	749482 T	31-10-2003
			US	6310185 B1	30-10-2001
			US	6518415 B1	11-02-2003
			US	5874060 A	23-02-1999

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

JARRELL, Brenda, Herschbach
Choate, Hall & Stewart LLP
Two International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 28 November 2005 (28.11.2005)	
Applicant's or agent's file reference 2004858-0053	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/030437	International filing date *(day/month/year)* 26 August 2005 (26.08.2005)
International publication date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)* 27 August 2004 (27.08.2004)
Applicant WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
27 August 2004 (27.08.2004)	60/605,097	US	21 October 2005 (21.10.2005)
27 August 2004 (27.08.2004)	60/604,941	US	21 October 2005 (21.10.2005)
27 August 2004 (27.08.2004)	60/605,074	US	21 October 2005 (21.10.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Sita COPPOLINO
Facsimile No. (41-22) 338.89.65
Telephone No. +41 22 338 8451

000382

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

35

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

① SOLICITUD DE

[ ] Corrección de Error Material [x] Modificación de una solicitud

② SOLICITANTE

Nombre: WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED

Dirección: Little Connell, Newbridge, County Kildare, República de Irlanda

Nacionalidad o Domicilio: República de Irlanda

Lugar de Constitución: República de Irlanda

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

③ REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 TP 20.281

④ Numero de expediente

⑤ Descripción de la corrección o modificación solicitada

El solicitante presenta voluntariamente nuevo capitulo reivindicatorio

⑥ Comprobante de Pago No. 07-15044 Fecha 20-FEB-07

⑦ Anexos

[X] Comprobante de pago de la tasa.

[ ] Poderes, si fuere el caso.

[ ] Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA

C.C. 79.143.366 T.P. 20.281

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2000-F03

CL.
00373

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-03-27 15:13:57 Dep: 2020 NUEGREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII
Eva: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 348

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 7 - 15,044
FECHA : FEBRERO 20 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64016958	20/02/2007	34,825,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL : $	99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

REIVINDICACIONES

Lo que se reclama es:

1. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene glutamina, y que tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en: 1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 5) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

2. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio que contiene una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2;

donde dicho medio contiene glutamina; y

donde dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 3) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 4) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

3. El método de la reivindicación 1, donde dicha condición de cultivo celular, en dicha etapa de cambio de por lo menos una de las condiciones del cultivo, se selecciona del grupo que consiste en: 1) la temperatura; (2) el pH; 3) la osmolalidad; 4) el nivel de inductores químicos; y sus combinaciones.

4. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 10 mM.

5. El método de la reivindicación 1, donde la concentración de glutamina inicial de dicho medio es inferior o igual a 4 mM.

6. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 10 mM.

7. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad acumulada total de glutamina, por unidad de volumen, de dicho medio, es inferior o igual a 4 mM.

8. El método de la reivindicación 1, donde la glutamina solo se provee en el medio inicial, al comienzo del cultivo celular.

9. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^5 células/ml.

10. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos 2 x 10^6 células/ml.

11. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 1000 l de un cultivo.

12. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de provisión comprende la provisión de por lo menos aproximadamente 10.000 l de un cultivo.

13. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 30 a 42 grados Celsius.

14. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es de aproximadamente 37 grados Celsius.

15. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 25 a 41 grados Celsius.

16. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 29 a 35 grados Celsius.

17. El método de la reivindicación 1, donde dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 31 grados Celsius.

18. El método de la reivindicación 1, que además comprende una segunda etapa de cambio posterior a dicho primer cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, que comprende el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un tercer conjunto de condiciones al cultivo.

19. El método de la reivindicación 18, donde la segunda etapa de cambio comprende el cambio de por lo menos una condición de cultivo seleccionada del grupo que consiste en: 1) la temperatura; (2) el pH; 3) la osmolalidad; 4) el nivel de inductores químicos; y sus combinaciones.

20. El método de la reivindicación 18, donde dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer rango de temperatura que es de aproximadamente 27 a 37 grados Celsius.

21. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es entre 1 y 7 días.

22. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer período es de aproximadamente 4 días.

23. El método de la reivindicación 1, donde el total de dicho primer período y dicho segundo período es por lo menos 5 días.

24. El método de la reivindicación 1, donde, en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, el

nivel de lactato disminuye después de que el nivel de lactato en el cultivo alcanza un nivel máximo.

25. El método de la reivindicación 1, donde, en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, el nivel de amonio disminuye después de que el nivel de amonio en el cultivo alcanza un nivel máximo.

26. El método de la reivindicación 1, donde dicha cantidad total de dicho polipéptido producido es por lo menos 1,5 veces mayor que la cantidad de polipéptido producido en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dichas características del medio.

27. El método de la reivindicación 1, donde dicha cantidad total de dicho polipéptido producido es por lo menos 2 veces mayor que la cantidad de polipéptido producido en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dichas características del medio.

28. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo celular se provee además con componentes suplementarios.

29. El método de la reivindicación 28, donde dichos componentes suplementarios se proveen en múltiples intervalos.

30. El método de la reivindicación 28, donde dichos componentes suplementarios se seleccionan de un grupo que consiste en hormonas u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), reguladores, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en

concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.

31. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, y que tiene por lo menos dos características del medio seleccionadas del grupo que consiste en: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

32. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:

la provisión de un cultivo celular que comprende:

células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina, caracterizado por: 1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina a asparagina inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico a aminoácidos totales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina y asparagina superior a aproximadamente 16 mM;

el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

33. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio comprende un medio que contiene glutamina y que tiene una característica de medio seleccionada del grupo que consiste en:

1) una concentración inicial de aminoácidos mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina inicial a asparagina inicial inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina inicial a aminoácidos totales iniciales inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico inicial a aminoácidos totales iniciales de entre alrededor de 0,4 y 1; y 5) una concentración combinada de glutamina inicial y asparagina inicial superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 ó 31-33, donde:

los niveles de lactato son inferiores a aquellos niveles observados en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio;

los niveles de amonio son inferiores a aquellos niveles observados en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio; y

la cantidad total de polipéptido producido es por lo menos tan alta como aquella observada en condiciones idénticas, en medio idéntico, pero que carece de dicha característica de medio.

35. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo no es suplementado con componentes adicionales durante el transcurso de la producción de dicho polipéptido.

36. El método de la reivindicación 1, donde se sustituye la glutamina con glicilglutamina en dicho cultivo.

37. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mM.

38. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mM.

39. El método de la reivindicación 1, donde dicho medio tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en:

(1) una cantidad total acumulada de histidina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,7 mM;

(2) una cantidad total acumulada de isoleucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 3,5 mM;

(3) una cantidad total acumulada de leucina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 5,5 mM;

(4) una cantidad total acumulada de metionina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM;

(5) una cantidad total acumulada de fenilalanina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(6) una cantidad total acumulada de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM;

(7) una cantidad total acumulada de triptófano, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 1,0 mM;

(8) una cantidad total acumulada de tirosina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM; y

(9) una cantidad total acumulada de prolina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,5 mM.

40. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de serina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 10 mM.

41. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 8 mM.

42. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de asparagina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 12 mM.

43. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de fósforo, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 5 mM.

44. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de glutamato, por unidad de volumen en dicho medio, es menor que aproximadamente 1 mM.

45. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de pantotenato de calcio, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 20 mg/l.

46. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de nicotinamida, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mg/l.

47. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de piridoxina y piridoxal, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

48. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de riboflavina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 2,0 mg/l.

49. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de clorhidrato de tiamina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o las reivindicaciones 9-33 o las reivindicaciones 35-49, en donde el polipéptido es anti-GDF-8.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o las reivindicaciones 9-33 o las reivindicaciones 35-49, en donde el polipéptido es anti-LewY.

52. El método de la reivindicación 34, en donde el polipéptido es anti-GDF-8.

53. El método de la reivindicación 34, en donde el polipéptido es anti-LewY.

346

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

0036

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad

(31) *No.*	32) *Fecha*	(33) *País*
60/605,097	27/08/04	US
60/604,941	27/08/04	US
60/604,941	27/08/04	US

(51) Int Cl: **C07K 16/00, C07K 16/22, C07K 16/30, C12N 5/00, C12P 21/02**

(71)Solicitante(s) **WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED**

(72) Inventor(es) **DRAPEAU, Denis**
LUAN, Yen-Tuang
y Otros

(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: ***27/03/07***

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: ***26/08/05***
No. de solicitud **PCT/US2005/030437**

(87) Publicación internacional
Fecha: ***09/03/06***
N° publicación: **WO 2006/026445**

(54) Titulo: **PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDOS**

Reivindicación(es):

1. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular de producción de gran escala, que comprende las etapas de:
la provisión de un cultivo celular que comprende:
células de mamíferos que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, donde dicho gen se expresa en condiciones de cultivo celular; y un medio que contiene glutamina, y que tiene una característica del medio seleccionada del grupo que consiste en: 1) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor que aproximadamente 70 mM; 2) una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; 3) una relación molar de glutamina acumulada a aminoácidos totales acumulados inferior a aproximadamente 0,2; 4) una relación molar de ion inorgánico acumulado a aminoácidos totales acumulados de entre alrededor de 0,4 y 1; 5) una cantidad acumulada combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen, superior a aproximadamente 16 mM; y sus combinaciones; el mantenimiento de dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial, en un primer conjunto de condiciones de cultivo, durante un primer período suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable dentro de un rango de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviera en el primer conjunto de condiciones de cultivo; el cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, de manera de aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo; el mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo período, en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período, de manera de acumular el polipéptido en el cultivo celular.

Retiro folios 349 y 348
"Tarjetas"

342

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-030529- -00000-0000
Fec: 2007-05-27 16:13:57 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTES(Y)I
Ene: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 348

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [4] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [4]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [4]
- Descripción de la Invención [4]
- Dibujos de ser estos pertinentes [N]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [4]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha mayo 27 de 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

3400

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	**Radicación No.**	**7 30529**
	Solicitud internacional	**PCT/US2005/030437**
	Fecha inicio fase nacional	**27/03/2007**
	Trámite	**11**
	Evento	**378**
	Actuación	**430**
	Oficio No.	**8881**

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Commidad 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. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

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 Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 JUL. 2007
adpa11

