



No. 07-030535- -00008-0000

Fecha: 2012-07-27 15:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 523 RESPUESTA Folios: 35

**BAKER & MCKENZIE**

**Baker & McKenzie Colombia S.A.**  
NIT: 900.034.906-9

Av. 82 No. 10-62 Piso 6  
Bogotá  
Colombia

Tel: +57 1 634 1500  
Fax: +57 1 376 2211  
www.bakermckenzie.com

Doctor

José Luis Salazar

Jefe de División de Nuevas Creaciones (C)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

Referencia: Expediente No. 07.030.535

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Producción de proteína de fusión de TNRF-Ig"

Solicitante: Wyeth Research Ireland Limited

**RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 129**

**DEL 14 DE MARZO DE 2012, OFICIO NO. 04099 (EXAMEN DE FONDO)**

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término de prórroga solicitado en mi memorial 07-030535-00006-0000 de fecha 6 de junio de 2012:

**1. Objeciones del Examinador**

### 1.1 Reivindicaciones

Su Despacho menciona las siguientes observaciones:

- 1) Existen numerosas reivindicaciones independientes que reclaman un método para la producción de TNFR-Fc en un cultivo celular, en donde no es evidente la diferencia entre las características esenciales de dichas reivindicaciones. Se recomienda dejar una única reivindicación independiente de esta categoría y las condiciones opcionales listarlas así o como(SIC) reivindicación dependiente (reivindicación 1, 2, 31, 32 y 50);
- 2) El método reclamado para la producción de TNFR-Fc en un cultivo celular, de la reivindicación independiente 1, debe ser caracterizado indicando todos los elementos involucrados y las condiciones experimentales empleadas. Así, se debe definir la línea celular, el medio específico de cultivo y las condiciones de cultivo. Indicando además, las condiciones para cada uno de los periodos de cultivo;
- 3) A pesar que la reivindicación 3 menciona algunas de la condiciones de cultivo a modificar, no se establece los rangos de variación de las mismas y por tanto no es posible definir las condiciones de cultivo. Lo mismo aplica para la reivindicación 19;
- 4) Los rangos de variación de temperatura en los distintos conjuntos de condiciones se superponen, por lo que no es clara la diferenciación de los mismos (reivindicaciones 13-17,20);
- 5) Varias reivindicaciones se refieren a resultados a alcanzar con la invención pero no aportan características técnicas de la misma (reivindicaciones 26, 27,34 y última etapa de 1,2, 31, 32 y 50);
- 6) Deben definirse los componentes suplementarios a aplicar en el cultivo (reivindicación 28);

### 1.2 Nivel Inventivo

Sobre el requisito del nivel inventivo, el Examinador establece que una persona del nivel técnico medio, versada en la materia, ensayaría las soluciones que se proponen en el documento "M. Gawlitzek, et. al. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, VOL 68, No. 6: 637\_646" (D1) y llegaría de manera obvia a la solución que se propone en la presente solicitud. Particularmente, el Examinador considera que las reivindicaciones 1-50 carecen de nivel inventivo debido a las enseñanzas contenidas en dicho documento.

El Examinador establece:

*“El documento Gawlitzek, et.al (D1) divulga el efecto de la acumulación de amonio en el cultivo de células que producen TNFR-Ig (resumen). Este documento estudia la variación en la concentración de amonio en el medio de cultivo y su efecto sobre el crecimiento y N-glicosilación celular. Para los ensayos se utiliza un reactor de 10-3 litros, usando células de ovarios de hámster chino transformadas que secretan TNFR-Ig (materiales pag 638). Además, se suministran las condiciones para el cultivo, pH, temperatura, buffer (materiales pag 638). Se destaca la afectación en la N-glicosilación de la molécula TNFR-Ig cuando se adiciona mas de 5mM de amonio al medio (fig 3, tabla 1).*

*La diferencia entre D 1 y la materia reclamada en la solicitud en estudio esta dada por que esta última indica que el medio contiene glutamina, y que tiene una característica del medio determinada para la proporción de glutamina y aminoácidos o glutamina y asparagina, ó cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen, mientras que D1 no menciona explícitamente esta proporción de glutamina/asparagina u otros aminoácidos.*

*Tal diferencia no parece conferir efecto al cultivo pues en ambos casos la producción de TNFR-Ig es similar.*

*El problema técnico objetivo es proveer un método para la producción de TNFR-Ig en un cultivo celular de producción de gran escala usando una cantidad de glutamina ó aminoácidos acumulados controlada.*

*Sin embargo, a partir de la divulgación de D1 resultaba evidente la ventaja técnica que confería en la producción de TNFR-Ig el hecho de controlar la adición de glutamina, o de amonio en general para obtener valores de N-glicosilación homogéneos entre las moléculas producidas, disminuyendo con esto la variación en el producto biotecnológico. Adicionalmente, la solicitud también indica una concentración similar de glutamina, pues la reivindicación 7 de la solicitud reclama que la cantidad acumulada total de glutamina por unidad de volumen, es menor o igual a 4mM.*

*Por último, se resalta que debido a la falta de divulgación de las condiciones de elaboración del método reclamado, no resulta evidente cual es la diferencia con el estado de la técnica.*

”

## **2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud**

### **2.1 Reivindicaciones**

2.1.1. En relación con la primera observación al capítulo reivindicatorio el solicitante desea manifestar que ha modificado el texto del mismo y que aunque no esta de acuerdo con dejar una sola reivindicación independiente ha decidido hacerlo solo con el objetivo de hacer expedito el otorgamiento del derecho de patente a la presente invención.

2.1.2. En cuanto a la segunda observación el solicitante considera que la presente invención cita sistemas mejorados para producir polipéptidos mediante cultivo celular; una persona medianamente versada en la materia entendería, de manera muy clara, los valores y rangos citados en las reivindicaciones.

Es muy importante hacer notar que el solicitante ha encontrado características de medio y por esto la presente invención describe características de medio que pueden aportar beneficios en la producción en un cultivo celular de TNFR-Ig. La especificación, incluidos los ejemplos, soporta de manera completa la claridad y la importancia de las características del medio citadas en las reivindicaciones. Los ejemplos en la especificación de la presente invención suministra los resultados de pruebas experimentales exhaustivas, no solo con diferentes medios, sino con una variedad de proteínas y tipos de células. Por lo tanto, los métodos reivindicados no se deben limitar para utilizarse con solo un específico grupo de condiciones. Por favor, revise la tabla de adelante la cual proporciona detalles de algunos de los soportes experimentales de las características del medio citadas en las reivindicaciones.

Tabla. Esbozo explicativo de los ejemplos experimentales y la relevancia de la materia reivindicada (con referencias de ejemplo a los párrafos de la solicitud PCT publicada WO 2006/026447).

| Ejemplo(s) | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevancia de la invención reivindicada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | <p>El ejemplo 1 documenta el esfuerzo inicial para desarrollar un nuevos medios concentrados de lote, para la producción de proteínas de interés en bioreactores a gran escala que requieren alimentaciones mínimas. Las células CHO desarrolladas por ingeniería para expresar un anticuerpo monoclonal contra el factor 8 del crecimiento y la diferenciación ("anti-GDF-8") se utilizaron para ensayar nuevos medios para realización de lote, por ejemplo, Medio 1 y Medio 2 (por favor ver el párrafo 204, página 63 t la tabla 1 en la página 63 a 65). El Medio 1 exhibió un incremento significativo en la densidad celular final y viabilidad sobre el medio de control (Medio 3) en un proceso de lote (favor ver figura 2) con una tasa de crecimiento comparable al medio 2 (favor ver figura 1).</p> <p>Debido a la inesperada tasa de crecimiento, los cultivos se alimentaron con el medio 4 después del día 5.</p> | <p>Se reconoció la relevancia de varios parámetros:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Aminoácidos totales acumulados &gt; 70 mM (por favor ver párrafo 207, página 65), relevante para la reivindicación 1, característica 1 y en los Medios 1-3, se determinaron las características para tener unos límites de toxicidad bajos (por favor ver párrafo 208, página 65)</li><li>- Suministro suplementario de asparagina en el día 10 (por favor ver párrafo 208, páginas 46-47), relevante a la reivindicación 1, característica 2</li><li>- Osmolaridad inferior, por ejemplo, al disminuir la cantidad de partida de NaCl (por favor ver párrafo 210, página 47), relevante a la reivindicación 1, característica 4</li></ul> |
| 4          | <p>Se probaron los niveles de hierro en el Medio concentrado 1 en comparación con la respuesta a la dosis de hierro de las células anti-GDF-8 en el Medio 1 y en el Medio 2 (por favor ver párrafos 239 a 241, página 78).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"><li>- Niveles de hierro adaptados para medios altamente concentrados como por ejemplo el requerido por la reivindicación 1, característica 1</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2,3 | <p>El ejemplo 2 documenta el proceso de desarrollar medios de alimentación concentrados de cultivos de célula con y sin glutamina con base en el medio de alimentación Medio 4 (por favor ver párrafo 213, página 66). El Medio 4 12X, es decir, el "Medio 5" se encontró particularmente útil con suministro suplementario de Asn (por favor ver tabla 7, página 72).</p> <p>En el ejemplo 3, se probaron cultivos de alimentación de lote de las células CHO que expresan el polipeptido anti-GDF-8. Se encontró que un nivel de glutamina disminuido, es decir, utilizando el Medio 5 sin suministro suplementario de glutamina pero con asparagina, simplifica el proceso de cultivo a gran escala y es benéfico para la expresión de proteína, los niveles de lactato y amonio, y la reducción de la osmolaridad final. Condiciones diferentes a las de control tuvieron una proporción de glutamina/asparagina (Gln/Asn) de menos de 2.</p> <p>Los datos en las figuras 3-12 (por favor ver ejemplo 3, páginas 73 - 74, sección de Resultados y Conclusiones donde se describen los efectos) muestran que una proporción de menos de 2 da como resultado mas bajos nivel de amoniaco (por favor ver figuras 5, 10) y lactato (por favor ver figuras 6, 11) y mayores títulos de producto (por favor ver figuras 7, 12) que un medio con una proporción</p> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Los inventores encontraron que ciertas características del medio podrían contribuir positivamente con la producción de polipéptido.</li><li>- Niveles de inicio inferiores y/o de glutamina acumulada en un proceso de cultivo de célula con medios concentrados definidos se encontraron como benéficos para la productividad de polipeptidos, la densidad/viabilidad celular, los niveles de lactato o amoniaco; lo que simplifica el proceso de cultivo.</li><li>- Al mismo tiempo, se suministro suplemento de Asn al medio 5, conduciendo a índices de Gln/Asn &lt; 2, relevante a la característica 2 de la reivindicación 1.</li></ul> |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

7

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | Gln/Asn mayor de 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 5 y 6 | <p>Las condiciones de producción para un polipéptido anti-Lewis Y se ensayaron utilizando el Medio 1 optimizado para producción de anti-GDF-8, sustitución de glutamato por glutamina (ejemplo 5), o glutamina y glucosa (ejemplo 6).</p> <p>En estos estudios, descrito en los ejemplos 5 y 6, se evaluaron los efectos de la sustitución del glutamato por glutamina en el proceso del bioreactor y mostró que el título de la proteína en los reactores alimentados con glutamato era mayor comparado con aquellos que se alimentaron con glutamina.</p>                                                                | <p>La observación de que menos glutamina dio como resultado mejor producción de polipéptido en 2 diferentes líneas celulares (líneas celulares que producen anti-GDF-8 y anti-Lewis Y) condujeron a los inventores a considerar que sería una estrategia aplicable utilizar niveles relativos mas bajos de glutamina.</p>                                                                                          |
| 7     | <p>Además de los desarrollos descritos en los ejemplos 2, 3, 5 y 6, el ejemplo 7 describe el desarrollo de un lote ávido de glutamina o de un proceso de alimentación de lote mas útil en reactores a gran escala (ver párrafo 259, página 85).</p> <p>Para este fin se aplicaron dos medios modificados basados en el medio 1, el Medio 7 y el medio 8, (por favor ver tabla 13, páginas 87 y 88) en un proceso de producción de anti-GDF-8. Los resultados mostraron que, combinar un proceso de lote con una estrategia de falta de glutamina daba como resultado un incremento de al menos 40% de incremento en la</p> | <p>- Todos los procesos de lote y de alimentación de lote como se aplicaron (por favor ver párrafos 263 y 265, páginas 86-87) cumplen las características 2, 3 y 4 de la reivindicación 1, mientras que el medio de control no.</p> <p>- Todos los procesos con estas características suministraron títulos de producto mayores (por favor ver figura 27, todas las curvas en comparación con -♦- Control FB")</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | productividad sobre el proceso de alimentación de lote para células anti-GDF-85 células (por favor ver párrafo 267, página 89).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 8, 9, 10 y 14 | <p>Además de los ejemplos 2, 5 y 6, el ejemplo 8 confirma el papel de las concentraciones acumuladas relativas y totales de la glutamina y asparagina.</p> <p>En los ejemplo 9, 10 y 14, el Medio 9 (por favor ver tabla 14, páginas 91-92) se aplicó con varias modificaciones en la producción de anti-GDF-8.</p> <p>Los ejemplos 9 y 10 suministran una optimización de las concentraciones relativas y combinadas de las concentraciones de glutamina y asparagina. por ejemplo, el ejemplo 10 encuentra que el Medio 9 con 4 o 13 mM y 21 mM de asparagina produce los mas altos títulos de anti-GDF-8 (por favor vea el párrafo 282, página 96 y la figura 46).</p> <p>En el ejemplo 14, se determinó, mediante análisis estadístico, que los niveles totales óptimos de glutamina y asparagina (por favor ver tablas 24 y 25, páginas 103 y 104) estaban entre 16 mM y 36 mM, es decir, mayor de 16 mM, lo que resulta en mayores títulos de producción (por favor ver párrafo 296, página 103).</p> | <p>- Los medios con una concentración relativa de Gln/Asn mayor de 2 (característica 2 de la reivindicación 1) y/o un nivel de glutamina y asparagina combinados mayor de 16 mM (característica 5 de la reivindicación 1) suministra mejoras adicionales en el cultivo celular, por ejemplo, título de producto mayores.</p> |
| 11, 12 y 13   | Los efectos de los niveles de aminoácidos totales, vitaminas, oligoelementos, niveles de hierro en los ejemplos 11, 12 y 13. El ejemplo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <p>Se confirmó, adicionalmente, que ciertas características del medio pueden conferir densidades y títulos celulares mayores:</p> <p>- Concentración de aminoácidos totales</p>                                                                                                                                              |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <p>13, por ejemplo, compara las concentraciones iniciales y acumuladas de los aminoácidos y la proporción molar de los iones inorgánicos totales a los aminoácidos totales en el Medio 1, 9 y el medio de control 3. Las concentraciones iniciales y totales de aminoácidos fueron &gt; 70 mM tanto en el medio 1 como en el 9, pero solamente 34 mM, o 64 mM en el Medio 3. El Medio 3 tiene una proporción alta de ión/aminoácido total de 1,75; el Medio 1 y 9 tuvo una proporción de aproximadamente 0,7.</p> <p>Tanto el Medio 1 como el Medio 9 se desempeñaron mejor que el Medio 3 indicando que suministrar aminoácidos en concentraciones mayores de aproximadamente 70 mM podría ser suficiente para suministrar resultados superiores en cultivos celulares, es decir, densidades de células y títulos (por favor ver párrafo 293, página 101, y figuras 57 y 58).</p> | <p>mayor de, aproximadamente, 70 mM (característica 1 de la reivindicación 1)</p> <p>- índice molar reducido de iones inorgánicos acumulados a aminoácidos totales por debajo de 1,0 (característica 4 de la reivindicación 1).</p>                                                                                                                               |
| 15 | <p>Se probaron tres modificaciones en el medio de cultivo celular desarrolladas en los ejemplos 1-14 utilizando células CHO que expresan un anticuerpo monoclonal IgG1 del péptido anti-Abeta humanizado ("células anti-Abeta") en una escala de 130 L, o 500 L. Todas las condiciones del medio probadas mostraron mejoras en el crecimiento celular, la viabilidad, el título, los niveles reducidos de lactato y los</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <p>Estos resultados validan los datos generados en los ejemplos 1-14 e indican que las características del medio y las condiciones del cultivo desarrollado se pueden generalizar para diferentes polipéptidos y proteínas así como también las escalas de producción, relevantes para la producción a gran escala del cultivo celular de la reivindicación 1</p> |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <p>niveles reducidos de amoniaco. También se encontró que las condiciones del medio que contienen menos glutamina no eran sensibles a la escala. El proceso duplicado también mostró una muy buena reproducibilidad corrida a corrida.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 16 | <p>En el ejemplo 16, se probaron las características mejoradas del medio encontradas para la producción de tres diferentes polipéptidos incluyendo las proteínas de fusión no anticuerpo tal como TNFR-Fc. Las células CHO que expresan una proteína de fusión dimérica que incluyen la porción de unión del ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton (p75) ligado a la porción Fc del IgG1 ("células TNFR-Ig") fueron cultivadas en el Medio 9 para la producción en bioreactor. Los resultados se muestran en las figuras 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72 y muestran que todas las condiciones produjeron buen crecimiento celular, alta viabilidad celular y un alto título final total (por favor vea el párrafo 302, página 109)</p> | <p>El análisis del crecimiento celular, la viabilidad celular y el título del producto final total demostraron claramente que las condiciones del medio desarrolladas y optimizadas en los ejemplos 1-15 son aplicables para una producción reproduciblemente fuerte de TNFR-Fc, como en la reivindicación 1</p> |
| 17 | <p>Comparación del desempeño de las condiciones del cultivo en bioreactores a pequeña y gran escala</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <p>Confirmación de que las características relevantes del cultivo desarrolladas utilizando bioreactores a pequeña escala eran aplicables a la producción en bioreactor a gran escala como en la reivindicación 1</p>                                                                                             |

2.1.3. En relación con la observación a las reivindicaciones 3 y 19 relacionadas con el rango de variación, el solicitante desea manifestar que tanto la reivindicación 3 como la 19 están correctamente definidas. Dichas reivindicaciones limitan las condiciones del tipo de cultivo celular que se modifica y no requieren, de ninguna manera, incluir rangos específicos para ser válidas como reivindicaciones adecuadas.

2.1.4. En relación con la observación a las reivindicaciones 13-17 y 20 relacionada con los rangos de temperatura y su supuesta superposición el solicitante desea manifestar que todo parece indicar que su Despacho esta en un error. Por favor, note que el solicitante desea reivindicar los rangos de las posibles temperaturas para el primero, segundo y tercer conjunto de condiciones. Para el primer conjunto de condiciones aparece un primer rango en la reivindicación 13 se establece como de 30 a 42 grados, como limitación para este rango en la reivindicación 14 aparece 37 grados. Si se desea limitar un rango previo el siguiente rango que escoja deberá estar incluido en el primero y de ninguna manera por fuera de este. En el presente caso la limitación al rango es una temperatura puntual que esta dentro del rango inicial por lo cual dicha limitación es correcta. Situación similar se presenta con el segundo y tercer conjunto de condiciones. Por otro lado si su Despacho se refiere a que los rangos de temperatura presentan superposiciones si se consideran las temperaturas del primer conjunto de condiciones, el segundo conjunto de condiciones y el tercer conjunto de condiciones, debe ser claro que cada conjunto de condiciones es diferente y por lo tanto se deben mirar de manera independiente y por lo tanto no se podría hablar de superposición.

De otro lado note que la reivindicación 1 especifica que, al menos, se cambia una condición del cultivo. La reivindicación dependiente 13 especifica que el primer conjunto de condiciones comprende un primer rango de temperatura que es aproximadamente 30 a 42 grados Celsius. La reivindicación dependiente 15 establece que el segundo conjunto de condiciones comprende un segundo rango de temperatura que es de aproximadamente 25 a 41 grados Celsius. Estas dos condiciones tomadas en conjunto dan como resultado un cambio en las condiciones del cultivo celular. Las reivindicaciones 13 y 15 cuando se "sobreponen" como lo sugiere su Despacho, dan como resultado un método que incorpora un cambio en las condiciones del cultivo en las cuales se modifica la temperatura del cultivo celular ( es decir, se efectúa un cambio).

2.1.5. En referencia a la objeción sobre resultado a alcanzar hecha a las reivindicaciones 26, 27, 34 y última etapa de la 1, 2, 31, 32 y 50, el solicitante desea manifestar que en la reivindicación 1 se especifica que "el TNFR-Ig se acumula en el cultivo celular". Sin embargo pone de presente que la reivindicación 1 esta dirigida a: " Un método para la producción de TNFR-Ig en un cultivo celular de producción de gran escala". Por lo tanto, se produce el polipéptido TNFR-Ig, y por lo tanto la cita " el TNFR-Ig se acumula en el cultivo celular" no es simplemente un resultado a alcanzar.

No obstante lo anterior y con el fin de hacer expedito el otorgamiento del derecho de patente ha consentido en suprimir la frase: "de manera de acumular TNFR-Ig en el cultivo celular" de la reivindicación 1.

Por otro lado, el solicitante a hecho modificaciones o supresiones en las otras reivindicaciones por lo que dicha objeción se debe considerar como superada.

2.1.6. En relación con la observación sobre la reivindicación 28, el solicitante también desea manifestar que no esta de acuerdo, pero que con el fin de hace expedito el otorgamiento ha limitado dicha reivindicación y por lo tanto ha suprimido la reivindicación 30 la cual resultaría redundante.

## 2.2 Nivel inventivo

El nivel inventivo de una solicitud se encuentra definido en el Artículo 18 de la Decisión 486 y se establece cuando *"si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Contrario a lo que plantea el Examinador, el documento del arte previo citado no afecta el nivel inventivo de la presente solicitud por cuanto no es posible derivar la presente invención a partir de las enseñanzas presentadas en el documento D1.

La acción oficial observa que el documento D1 analiza el efecto de la concentración de amonio sobre la glicosilación del TNRF-IgG y admite que D1 no menciona ninguna de las características del medio en las reivindicaciones. La presente acción oficial menciona

que las diferencia entre las reivindicaciones y D1 "no parecen conferir efecto al cultivo pues en ambos casos la producción de TNFR-Ig es similar". Desafortunadamente la acción oficial no menciona cómo o por qué la producción de D1 se considera similar a la producción descrita en la presente solicitud. De otro lado la presente invención trata el problema de un sistema mejorado para producción a gran escala de proteínas, tal como TNFR-Ig. Mientras que la presente invención suministra abundantes datos para demostrar la relevancia de las características del medio reivindicadas, D1 no describe ni sugiere ninguna de las características de medio citadas en las reivindicaciones para manejar este problema. Por ejemplo, D1 cual concentración de glutamina en relación con asparagina u otros aminoácidos sería benéfica mientras que el ejemplo 3 de la especificación en la presente invención muestra cultivos celulares que tienen una proporción de glutamina a asparagina de menos de 2 tuvieron menores niveles de amoníaco (por favor ver figura 10) y lactato que los controles. La disminución de la acumulación de amoníaco y lactato así lograda es un efecto sorprendente asociado con el uso del método reivindicado que no se podía contemplar fácilmente a la luz de la divulgación de la técnica anterior.

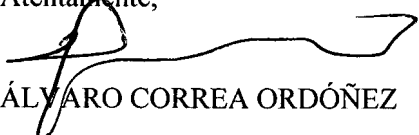
De acuerdo con lo anterior solicito, muy comedidamente, volver a analizar con sumo detenimiento este asunto, para que se puedan corroborar todos los argumentos suministrados por el solicitante y quede claro así el nivel inventivo de la presente solicitud.

### **3. Solicitudes concedidas en otros países para esta misma invención.**

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que patentes en Los Estados Unidos, Canadá, Europa (2 patentes), Hong Kong, Israel, Corea, México, Malasia, Filipinas, Singapur, Taiwán, Ucrania, Vietnam, China, Panamá, Guatemala y Honduras, equivalentes a la presente solicitud colombiana, han sido otorgadas. Aún cuando entiendo que estas decisiones de ninguna manera obligan al Despacho para decidir de igual forma, considero que por tratarse de una pregunta fáctica la determinación de la existencia de nivel inventivo, las decisiones de otras oficinas de patentes constituyen un antecedente persuasivo en la materia.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

2012/01/12 15

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
-/-

|                                          |                |                                          |
|------------------------------------------|----------------|------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 12 - 0077457                         |
|                                          |                | Bogotá D.C., Julio 27 de 2012 - 08:55:40 |

|                                |                |
|--------------------------------|----------------|
| RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE | NI 900.034.906 |
|--------------------------------|----------------|

| *** Soporte del Pago *** |           |        |            |            |            |
|--------------------------|-----------|--------|------------|------------|------------|
| TIPO PAGO                | BANCO     | CUENTA | No. PAGO   | FECHA PAGO | VR. PAGO   |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 49474  | 17/05/2012 |            | 260.100.00 |
| RECIBO DE CA             | 999999999 | 70104  | 10/07/2012 |            | 820.000.00 |

| *** Conceptos Pagados *** |                         |                                                           |                          |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
| CANT.                     | RENTISTICO              | CONCEPTO                                                  | Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO |
| 36                        | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES | 30.000.00 1.080.000.00   |
|                           |                         |                                                           | \$1.080.000.00           |

SON: UN MILL&OACUTE;N OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de TNFR-Ig 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 TNFR-Ig, 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.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio contiene

una relación molar de glutamina acumulada a asparagina acumulada inferior a aproximadamente 2; y

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;

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  $2 \times 10^5$  células/ml.
10. El método de la reivindicación 1, donde la densidad inicial de dichas células de mamífero es por lo menos  $2 \times 10^6$  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 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.

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 dicho cultivo celular se provee además con componentes suplementarios en 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.

27. El método de la reivindicación 26, donde dichos componentes suplementarios se proveen en múltiples intervalos.

28. El método de la reivindicación 1, en donde el medio es 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;

29. El método de la reivindicación 1, en donde el medio es 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;

30. 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.

31. El método de la reivindicación 1, donde dicho cultivo no es suplementado con componentes adicionales durante el transcurso de la producción de dicho TNFR-Ig.

32. El método de la reivindicación 1, donde se sustituye la glutamina por glicilglutamina en dicho cultivo.

33. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 25 mM.

34. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y prolina, por unidad de volumen en dicho medio, es mayor que aproximadamente 35 mM.

35. 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; y

(8) una cantidad total acumulada de tirosina, por unidad de volumen, mayor que aproximadamente 2,0 mM;

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. 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.

44. 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.

45. 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.

46. El método de la reivindicación 1, en donde el TNFR-Ig es TNFR-Fc.

BM\_ALM/BOGDMS-#1149858-v1-P2007\_000036-0720.docx

23



(11) **EP 1 992 697 B1**

(12) **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45) Date of publication and mention of the grant of the patent:  
**17.03.2010 Bulletin 2010/11**

(51) Int Cl.:  
**C12N 15/62<sup>(2006.01)</sup> C07K 14/715<sup>(2006.01)</sup>**  
**C12P 21/02<sup>(2006.01)</sup>**

(21) Application number: **08005732.6**

(22) Date of filing: **26.08.2005**

(54) **Production of TNFR-Fc**  
**Herstellung von TNFR-Fc**  
**Production de TNFR-Fc**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(84) Designated Contracting States:<br/><b>AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR</b><br/>Designated Extension States:<br/><b>AL BA HR MK YU</b></p> <p>(30) Priority: <b>27.08.2004 US 605379</b></p> <p>(43) Date of publication of application:<br/><b>19.11.2008 Bulletin 2008/47</b></p> <p>(62) Document number(s) of the earlier application(s) in accordance with Art. 76 EPC:<br/><b>05791482.2 / 1 781 802</b></p> <p>(73) Proprietor: <b>Wyeth Research Ireland Limited</b><br/><b>Newbridge</b><br/><b>Kildare (IE)</b></p> <p>(72) Inventors:<br/>• <b>Drapeau, Denis</b><br/><b>Salem, NH 03079 (US)</b></p> | <p>• <b>Luan, Yen-Tung</b><br/><b>Chelmsford, MA 01824 (US)</b></p> <p>• <b>Mercer, James R.</b><br/><b>East Derry, NH 03041 (US)</b></p> <p>• <b>Wang, Wenge</b><br/><b>North Chelmsford, MA 01863 (US)</b></p> <p>• <b>Lasko, Daniel R.</b><br/><b>Medford, MA 02155 (US)</b></p> <p>(74) Representative: <b>Denholm, Anna Marie et al</b><br/><b>Wyeth Pharmaceuticals</b><br/><b>Huntercombe Lane South</b><br/><b>Taplow</b><br/><b>Maidenhead</b><br/><b>Berkshire SL6 0PH (GB)</b></p> <p>(56) References cited:<br/><b>WO-A-96/39488 US-A- 5 447 851</b><br/><b>US-A- 5 721 121</b></p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

**EP 1 992 697 B1**

## EP 1 992 697 B1

*Results and Conclusions*

[0285] 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**

1. A method of producing a tumor necrosis factor-immunoglobulin Fc region fusion protein (TNFR-Fc) in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising:

mammalian cells that contain a gene encoding TNFR-Fc, 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 TNFR-Fc accumulates in the cell culture.

2. The method of claim 1, wherein said medium contains a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2; and

said medium has 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, (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

3. 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.

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

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

6. 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.

7. 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.

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

9. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least  $2 \times 10^5$  cells/mL.

## EP 1 992 697 B1

10. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least  $2 \times 10^6$  cells/mL.
11. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 1000 L of a culture.
- 5 12. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 10,000 L of a culture.
13. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 30 to 42 degrees Celsius.
- 10 14. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 37 degrees Celsius.
- 15 15. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 25 to 41 degrees Celsius.
16. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 29 to 35 degrees Celsius.
- 20 17. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 31 degrees Celsius.
- 25 18. The method of claim 1, further comprising a second changing step subsequent to the 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.
19. The method of claim 18, 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 inductant level, and combinations thereof.
- 30 20. The method of claim 18, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately 27 to 37 degrees Celsius.
21. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 1-7 days.
- 35 22. The method of claim 1, wherein said first period of time is approximately 4 days.
23. 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.
- 40 24. 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.
25. 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.
- 45 26. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced TNFR-Fc is at least 1.5-fold higher than the amount of TNFR-Fc produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.
- 50 27. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced TNFR-Fc is at least 2-fold higher than the amount of TNFR-Fc produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.
28. The method of claim 1, wherein said cell culture is further provided with supplementary components.
- 55 29. The method of claim 28, wherein said supplementary components are provided at multiple intervals.
30. The method of claim 28 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,

EP 1 992 697 B1

vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), amino acids, lipids, or glucose or other energy source.

- 5 31. The method of claim 1, wherein said culture is not supplemented with additional components over the course of producing said TNFR-Fc.
32. The method of claim 1, wherein glycylglutamine is substituted for glutamine in said culture.
- 10 33. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 25 mM.
34. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mM.
- 15 35. 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;
  - 20 (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; and
  - 25 (viii) a cumulative total amount of tyrosine per unit volume greater than approximately 2.0 mM.
36. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of serine per unit volume in said medium is greater than approximately 10 mM.
37. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 8 mM.
- 30 38. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 12 mM.
39. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of phosphorous per unit volume in said medium is greater than approximately 5 mM.
- 35 40. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of glutamate per unit volume in said medium is less than approximately 1 mM.
- 40 41. 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.
42. 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.
- 45 43. 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.
44. 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.
- 50 45. 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.
- 55 46. The method of claim 1, wherein said medium comprises a medium containing glutamine and having a medium characteristic selected from the group consisting of:

## EP 1 992 697 B1

(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.

47. A method of producing TNFR-Fc in a large-scale production cell culture comprising steps of;  
providing a cell culture comprising:

mammalian cells that contain a gene encoding TNFR-Fc, 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 TNFR-Fc accumulates in the cell culture.

48. The method of claim 47, wherein said medium has medium characteristics 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.

49. The method of any one of claims 1-2 or 46- 48, 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 TNFR-Fc is at least as high as that observed under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.

50. A method of claim 1 or 47 wherein the produced TNFR-Fc is isolated and/or purified for use as or in the preparation of pharmaceuticals.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Tumornekrosefaktor-Immunglobulin-Fc-Region-Fusionsproteins (TNFR-Fc) in einer Zellkultur einer großtechnischen Produktion, umfassend folgende Schritte:

Bereitstellen einer Zellkultur umfassend:

Säugetierzellen, die ein für TNFR-Fc kodierendes Gen enthalten, wobei das Gen unter Zellkulturbedingung exprimiert wird; und  
ein Medium, das Glutamin enthält und eine Medieneigenschaft aufweist, die ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: (i) einer kumulativen Aminosäuremenge pro Volumeneinheit über ungefähr 70 mM, (ii) einem Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulativem Asparagin unter ungefähr 2, (iii) einem Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulativer Gesamtaminosäure unter ungefähr 0,2, (iv) einem Molverhältnis zwischen kumulativem anorganischem Ion und kumulativer Gesamtaminosäure zwischen ungefähr 0,4 und 1, (v) einer kombinierten kumulativen Menge von Glutamin und Asparagin pro Volumeneinheit über ungefähr 16 mM, und Kombinationen davon;



(11) **EP 1 781 802 B1**

(12) **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

- (45) Date of publication and mention of the grant of the patent:  
**21.10.2009 Bulletin 2009/43**

(21) Application number: **05791482.2**

(22) Date of filing: **26.08.2005**
- (51) Int Cl.:  
**C12P 21/02 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)**

(86) International application number:  
**PCT/US2005/030439**

(87) International publication number:  
**WO 2006/026447 (09.03.2006 Gazette 2006/10)**

(54) **PRODUCTION OF A TNFR-IG FUSION PROTEIN**  
**HERSTELLUNG VON EINEM TNFR-IG FUSIONSPROTEIN**  
**PRODUCTION D'UNE TNFR-IG PROTEINE DE FUSION**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(84) Designated Contracting States:<br/><b>AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR</b><br/>Designated Extension States:<br/><b>AL BA HR MK YU</b></p> <p>(30) Priority: <b>27.08.2004 US 605379 P</b></p> <p>(43) Date of publication of application:<br/><b>09.05.2007 Bulletin 2007/19</b></p> <p>(60) Divisional application:<br/><b>08005732.6 / 1 992 697</b></p> <p>(73) Proprietor: <b>Wyeth Research Ireland Limited Newbridge Kildare (IE)</b></p> <p>(72) Inventors:<br/>• <b>DRAPEAU, Denis Salem, NH 03079 (US)</b></p> | <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>LUAN, Yen-Tung Chelmsford, MA 01824 (US)</b></li><li>• <b>MERCER, James, R. Derry, NH 03041 (US)</b></li><li>• <b>WANG, Wenge North Chelmsford, MA 01863 (US)</b></li><li>• <b>LASKO, Daniel R. Medford, MA 02155 (US)</b></li></ul> <p>(74) Representative: <b>Denholm, Anna Marie Wyeth Pharmaceuticals Huntercombe Lane South Taplow Maidenhead Berkshire SL6 0PH (GB)</b></p> <p>(56) References cited:<br/><b>WO-A-96/39488 US-A- 5 447 851 US-A- 5 721 121</b></p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

**EP 1 781 802 B1**

## EP 1 781 802 B1

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

#### Materials and Methods

5 [0282] 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  $3 \times 10^6$  viable cells/ml in Medium 9 for the production bioreactor step.

#### Results and Conclusions

[0283] 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.

15 [0284] 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 inductants sodium butyrate, and HMBA.

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

#### Materials and Methods

25 [0285] 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

30 [0286] 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

40 1. A method of producing a tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin fusion protein (TNFR-Ig) in a large-scale production cell culture comprising the steps of:

providing a cell culture comprising:

45 mammalian cells that contain a gene encoding TNFR-Ig, 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  
50 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;

55 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

## EP 1 781 802 B1

of time so that TNFR-Ig accumulates in the cell culture.

2. The method of claim 1, wherein said medium contains a molar cumulative glutamine to cumulative asparagine ratio of less than about 2; and  
 5 said medium has 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, (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.
- 10 3. 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.
- 15 4. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 10 mM.
5. The method of claim 1, wherein the initial glutamine concentration of said medium is less than or equal to 4 mM.
- 20 6. 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.
7. 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.
- 25 8. The method of claim 1, wherein glutamine is only provided in the initial medium at the beginning of the cell culture.
9. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least  $2 \times 10^5$  cells/mL.
10. The method of claim 1, wherein the initial density of said mammalian cells is at least  $2 \times 10^6$  cells/mL.
- 30 11. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 1000 L of a culture.
12. The method of claim 1, wherein the step of providing comprises providing at least about 10,000 L of a culture.
- 35 13. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 30 to 42 degrees Celsius.
14. The method of claim 1, wherein said first set of conditions comprises a first temperature range that is approximately 37 degrees Celsius.
- 40 15. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 25 to 41 degrees Celsius.
16. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 29 to 35 degrees Celsius.
- 45 17. The method of claim 1, wherein said second set of conditions comprises a second temperature range that is approximately 31 degrees Celsius.
- 50 18. The method of claim 1, further comprising a second changing step subsequent to the 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.
- 55 19. The method of claim 18, 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 inductant level, and combinations thereof.
20. The method of claim 18, wherein said third set of conditions comprises a third temperature range that is approximately

## EP 1 781 802 B1

27 to 37 degrees Celsius.

21. The method of claim 1, wherein said first period of time is between 1-7 days.
- 5 22. The method of claim 1, wherein said first period of time is approximately 4 days.
23. 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.
- 10 24. 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.
25. 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.
- 15 26. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced TNFR-Ig is at least 1.5-fold higher than the amount of TNFR-Ig produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.
- 20 27. The method of claim 1, wherein said total amount of said produced TNFR-Ig is at least 2-fold higher than the amount of TNFR-Ig produced under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.
28. The method of claim 1, wherein said cell culture is further provided with supplementary components.
- 25 29. The method of claim 28, wherein said supplementary components are provided at multiple intervals.
- 30 30. The method of claim 28 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.
31. The method of claim 1, wherein said culture is not supplemented with additional components over the course of producing said TNFR-Ig.
- 35 32. The method of claim 1, wherein glycylglutamine is substituted for glutamine in said culture:
33. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 25 mM.
- 40 34. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and proline per unit volume in said medium is greater than approximately 35 mM.
35. The method of claim 1, wherein said medium has a medium characteristic selected from the group consisting of:
  - 45 (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;
  - 50 (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; and
  - (viii) a cumulative total amount of tyrosine per unit volume greater than approximately 2.0 mM.
- 55 36. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of serine per unit volume in said medium is greater than approximately 10 mM.
37. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 8 mM.

EP 1 781 802 B1

- 38. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of asparagine per unit volume in said medium is greater than approximately 12 mM.
- 5 39. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of phosphorous per unit volume in said medium is greater than approximately 5 mM.
- 40. The method of claim 1, wherein the cumulative total amount of glutamate per unit volume in said medium is less than approximately 1 mM.
- 10 41. 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.
- 42. 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.
- 15 43. 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.
- 44. 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.
- 20 45. 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.
- 25 46. 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.
- 30 47. A method of producing TNFR-Ig in a large-scale production cell culture comprising steps of;
  - 35 providing a cell culture comprising:
    - mammalian cells that contain a gene encoding TNFR-Ig, which gene is expressed under condition of cell culture; and
    - 40 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;
  - 45 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;
  - 50 maintaining said culture for a second period of time under the second set of conditions and for a second period of time so that TNFR-Ig accumulates in the cell culture.
- 48. The method of claim 47, wherein said medium has medium characteristics of:
  - 55 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.

EP 1 781 802 B1

49. The method of any one of claims 1-2 or 46- 48, 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 TNFR-Ig is at least as high as that observed under otherwise identical conditions in otherwise identical medium that lacks said medium characteristic.

50. A method of claim 1 or 47 wherein the produced TNFR-Ig is isolated and/or purified for use as or in the preparation of pharmaceuticals.

15 Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Immunglobulin-Fusionsproteins (TNFR-Ig) in einer Zellkultur einer großtechnischen Produktion, umfassend folgende Schritte:

20 Bereitstellen einer Zellkultur umfassend:

Säugetierzellen, die ein für TNFR-Ig kodierendes Gen enthalten, wobei das Gen unter Zellkulturbedingung exprimiert wird; und  
 ein Medium, das Glutamin enthält und eine Medieneigenschaft aufweist, die ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: (i) einer kumulativen Aminosäuremenge pro Volumeneinheit über ungefähr 70 mM, (ii) einem Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulativem Asparagin unter ungefähr 2, (iii) einem Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulative Gesamtaminosäure unter ungefähr 0,2, (iv) einem Molverhältnis zwischen kumulativem anorganischem Ion und kumulativer Gesamtaminosäure zwischen ungefähr 0,4 und 1, (v) einer kombinierten kumulativen Menge von Glutamin und Asparagin pro Volumeneinheit über ungefähr 16 mM, und Kombinationen davon;  
 Halten der Kultur in einer anfänglichen Wachstumsphase unter einer ersten Reihe von Kulturbedingungen für einen ersten Zeitraum, der ausreicht, um den Zellen zu ermöglichen, sich bis zu einer Dichte lebender Zellen in einem Bereich von ungefähr 20%-80% der maximal möglichen Dichte lebender Zellen zu reproduzieren, wenn die Kultur unter der ersten Reihe von Kulturbedingungen gehalten würde;  
 Ändern von mindestens einer der Kulturbedingungen, so dass eine zweite Reihe von Kulturbedingungen angewendet wird;  
 Halten der Kultur für einen zweiten Zeitraum unter der zweiten Reihe von Kulturbedingungen und für einen zweiten Zeitraum, so dass das TNFR-Ig in der Zellkultur akkumuliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Medium ein Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulativem Asparagin unter ungefähr 2 enthält; und  
 das Medium zwei Medieneigenschaften aufweist, die ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: (i) einem Medium, das eine kumulative Aminosäuremenge pro Volumeneinheit über ungefähr 70 mM enthält, (iii) einem Molverhältnis zwischen kumulativem Glutamin und kumulativer Gesamtaminosäure unter ungefähr 0,2, (iv) einem Molverhältnis zwischen kumulativem anorganischem Ion und kumulativer Gesamtaminosäure zwischen ungefähr 0,4 und 1, (v) einer kombinierten kumulativen Menge von Glutamin und Asparagin pro Volumeneinheit über ungefähr 16 mM, und Kombinationen davon.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellkulturbedingung in dem Schritt zum Ändern von mindestens einer der Kulturbedingungen ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: (i) Temperatur, (ii) pH-Wert, (iii) Osmolalität, (iv) Gehalt chemischer Induktoren, und Kombinationen davon.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die anfängliche Glutaminkonzentration des Mediums kleiner als oder gleich 10 mM ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die anfängliche Glutaminkonzentration des Mediums kleiner als oder gleich 4 mM ist.