



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

09-45869

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA
CULTIVO CELULAR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ.
C.C. 79.143.368 de Bogotá.

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

icación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

①

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79.143.366 Usaquén TP 28281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: LUAN, Yen-Tung; WANG, Wenge; NOLAN, Ryan; DRAPEAU, Denis

Dirección: 3 Armand Drive, Chelmsford, Massachusetts 01824, Estados Unidos de América; 1 Hollow Ridge Road, North Chelmsford, Massachusetts 01863 Estados Unidos de América; 71 Montvale Avenue, Apt.5, Stoneham, Massachusetts 02180 Estados Unidos de América; 55 Old Farm Road, Salem, NB 03079, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/083947

Fecha 07.11.2007

Publicación Internacional No. WO/2008/063892

Fecha 29.05.2008

⑥

Título (54)

MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO CELULAR

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 5/00

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

08.11.2006

(31) Número de Solicitud

60/858,289

⑨

Comprobante de pago No.

09-18512; 09-18435; 09-18436; 09-18618;
08-100308

Fecha MARZO 6/09; MARZO 6/09; MARZO
6/09; MARZO 6/09; DIC 26/09

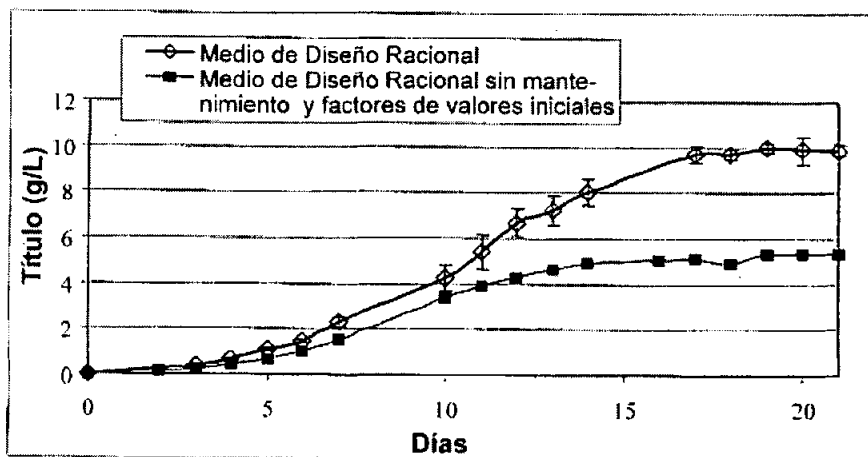
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

11 FIGURA CARATERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 May 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/063892 A2

(51) International Patent Classification:
C12N 1/00 (2006.01)

(74) Agents: PIERONI, Joseph, P. et al.; Fitzpatrick Cella
Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY
10112-3801 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/083947

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

(22) International Filing Date:
7 November 2007 (07.11.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/858,289 8 November 2006 (08.11.2006) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

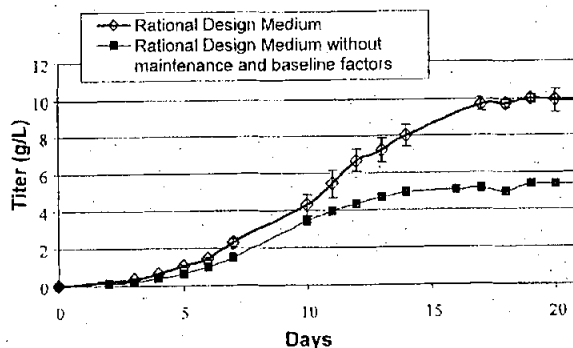
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LUAN, Yen-Tung
[US/US]; 3 Armand Drive, Chelmsford, MA 01824 (US).
WANG, Wenge [CN/US]; 1 Hollow Ridge Road, North
Chelmsford, MA 01863 (US). NOLAN, Ryan [US/US];
71 Montvale Avenue, Apt.5, Stoneham, MA 02180 (US).
DRAPEAU, Denis [US/US]; 55 Old Farm Road, Salem,
NH 03079 (US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(54) Title: RATIONALLY DESIGNED MEDIA FOR CELL CULTURE



(57) Abstract: This invention relates to methods for rationally designing cell culture media for use in cell cultures, e.g., cell cultures employed in polypeptide production; cell culture media designed with the disclosed methods; methods of producing a polypeptide of interest, e.g., an antibody, using such media; polypeptides produced using the methods and media disclosed herein; and pharmaceutical compositions containing such polypeptides. The rationally designed media contain a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest. The rationally designed media may contain a baseline-adjusted concentration, A, of at least one amino acid that is calculated according to the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is the concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is the concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is the multiplier for the desired peak cell density of the cell culture, N is the multiplier for the desired concentration of the polypeptide of interest, Y is the cell maintenance factor; and F is the baseline factor. This rationally designed media may also be used to produce a starting cell culture medium comprising a concentration, B, of at least one amino acid according to the formula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, wherein Z is a concentration of the amino acid in the feeding cell culture medium, and V is a volume of the feeding culture medium as a proportion of the desired cell culture medium volume.

WO 2008/063892 A2

- 1 -

TITLE

RATIONALLY DESIGNED MEDIA FOR CELL CULTURE

BACKGROUND OF THE INVENTION

Related Applications

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/858,289, filed November 8, 2006, the content of which is hereby incorporated by reference herein in its entirety

Field of the Invention

[0001] This invention relates to methods for rationally designing cell culture media for use in cell cultures employed in, e.g., polypeptide production; cell culture media designed with the disclosed methods; methods of producing large quantities of a polypeptide of interest, e.g., an antibody, using such media; polypeptides produced using the methods and media disclosed herein; and pharmaceuticals compositions containing such polypeptides. The invention is particularly useful in large-scale cell cultures. The methods and compositions disclosed herein are particularly useful to produce significant quantities of polypeptides in batch, fed-batch and perfusion animal cell cultures.

Related Background Art

[0002] A large proportion of biotechnology products, whether commercially available or only in development, are protein therapeutics; thus, there is a demand for production of these polypeptides in cell cultures. Furthermore, the cellular machinery of an animal cell (as opposed to, e.g., a bacterial cell) is often required to produce many forms of polypeptide therapeutics (such as glycosylated proteins or hybridoma-produced monoclonal antibodies (MAbs)). Consequently, there is an increasing demand for optimizing production of these polypeptides in cell cultures, and particularly in animal cell cultures.

[0003] As compared to bacterial cell cultures, animal cell cultures have lower production rates and typically generate lower production yields. Thus, a significant quantity of research focuses on animal cell culture conditions that optimize the polypeptide output, i.e., conditions that support high cell density and high titer. For example, it has been determined that maintaining glucose concentrations in cell culture media at low concentrations and culturing cells in a production phase at an osmolality of about 400 to 600 mOsm increases production of recombinant proteins by animal cell cultures, wherein culturing in all phases is also at a selected glutamine concentration (preferably between about 0.2 to about 2 mM). It has also been determined that restricted feeding of glucose to animal cell cultures in fed-batch processes controls lactate production without requiring the constant-rate feeding of glucose. Further, it is known that modification of the total cumulative concentration of amino acids, the concentration of individual amino acids, and the ratios of individual amino acids to each other (e.g., glutamine to asparagine) and to total amino acids (e.g., glutamine to total amino acids) in the media of a large-scale cell culture can result in substantially improved large-scale polypeptide production.

[0004] Traditionally, medium studies for animal cell cultures focus on three techniques: 1) enriching the medium components of the starting medium and increasing the frequency of culture feeding; 2) applying multi-factorial design to different medium strengths and different component concentrations; and 3) analyzing conditioned (spent) medium for amino acids, vitamins, and other components, and adding those components that are at low levels or are depleted.

These methods generally use cell density, viability and titer responses as indicators of optimization.

[0005] However, the above methods only indirectly detect the nutrient requirement for cells based on the end result, i.e., cell density, viability, and titer, rather than detecting and providing the cell with the actual nutrient requirement for optimized protein production.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The present invention provides methods for rationally designing cell culture media, e.g., large-scale cell culture media, for use in, e.g. large-scale cell cultures employed in polypeptide production; cell culture media, e.g., large-scale cell culture media, designed with the disclosed methods; methods of producing large quantities of a polypeptide of interest, e.g., an antibody, using such media; polypeptides produced using the methods and media disclosed herein; and pharmaceutical compositions containing such polypeptides. These methods and compositions are useful for culturing, e.g., batch, fed-batch, and perfusion culturing, of cells. These methods and compositions are particularly useful for large-scale culturing, e.g., batch, fed-batch, and perfusion culturing, of animal cells, e.g., mammalian cells.

[0007] A rationally designed medium of the present invention contains a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest.

[0008] In one embodiment, the invention provides a method of producing a polypeptide in a cell culture comprising providing a cell culture, comprising cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest, and a desired cell culture medium, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest; and, maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest. In one

embodiment of the invention, the desired cell culture medium comprises a baseline-adjusted amino acid concentration, A, according to the formula $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor.

[0009] In another embodiment, the invention provides a method of producing a polypeptide in a cell culture, comprising providing a cell culture, comprising cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and a starting cell culture medium, wherein the volume of the starting cell culture medium is about 60–99% of the volume of a desired cell culture medium volume; providing a feeding cell culture medium to the cell culture, wherein the volume of the feeding cell culture medium is about 1–40% of the desired cell culture medium volume, and wherein the resulting desired cell culture medium comprises a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest; and, maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest. In one embodiment of the invention, the resulting desired cell culture medium comprises a baseline-adjusted amino acid concentration, A, according to the formula

$A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor; and maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest. In another embodiment of the invention, the starting cell culture medium comprises a concentration, B, of the amino acid according to the formula $B=[A-(Z*V)]/(1-V)$,

wherein Z is a concentration of the amino acid in the feeding cell culture medium, and V is a volume of the feeding culture medium as a proportion of the desired cell culture medium volume. In another embodiment of the methods disclosed herein, Y is 0 to about 1.5. In yet another embodiment of the methods disclosed herein, F is about 1 to about 1.5. In a further embodiment of the methods disclosed herein, Y is 0 to about 1.5 and F is about 1 to about 1.5.

[0010] In one embodiment of the methods disclosed herein, the desired cell culture medium comprises greater than or equal to about 3 mM tyrosine. In another embodiment of the methods disclosed herein, the desired cell culture medium comprises: between about 7 mM and about 30 mM leucine; between about 7 mM and about 30 mM lysine; between about 7 mM and about 30 mM threonine; between about 7 mM and about 30 mM proline; and/or between about 7 mM and about 30 mM valine. In a further embodiment of the methods disclosed herein, the combined concentration of leucine, lysine, threonine, proline, and valine in the desired cell culture medium is between about 35 mM and about 150 mM. In yet another embodiment, the combined concentration of leucine, lysine, threonine, and valine in the desired cell culture medium is between about 60% and about 80% of the concentration of the total essential amino acids in the desired cell culture medium.

[0011] In one embodiment of the methods disclosed herein, the combined concentration of the essential amino acids in the desired cell culture medium is between about 30% and about 50% of the concentration of the total amino acids in the desired cell culture medium. In another embodiment of the methods disclosed herein, the concentration of amino acids in the desired cell culture medium is between about 120 mM and about 350 mM. In a further embodiment of the methods disclosed herein, the concentration of proline in the cell culture is maintained at greater than about 1 mM. In yet another embodiment of the methods disclosed herein, the concentration of proline in the cell culture is maintained at greater than about 2 mM. In some embodiments of the methods of producing a polypeptide, the cell culture is a large-scale cell culture. In other embodiments, the cells are animal cells.

[0012] A further aspect of the invention provides polypeptides produced according to the methods disclosed herein. Another aspect of the invention provides a pharmaceutical composition comprising a polypeptide produced according to the methods disclosed herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0013] A further aspect of the invention provides a method of cell culture comprising: providing a cell culture, comprising: cells; and a desired cell culture medium, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass and a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance; and maintaining the cell culture under conditions that allow growth and replication of the cells in the cell culture. In one embodiment of the invention, the desired cell culture medium comprises a baseline-adjusted amino acid concentration, A' , according to the formula $A' = [(M * X) + (Y * M * X)] * F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor. In some embodiments of the methods of cell culture, the cell culture is a large-scale cell culture. In other embodiments, the cells are animal cells.

[0014] A further aspect of the invention provides a cell culture medium, comprising a total concentration of amino acids from between about 120 mM and about 350 mM. Another aspect of the invention provides a cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest, comprising a total concentration of amino acids from between about 120 mM and about 350 mM.

[0015] Another aspect of the invention provides a cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest. In one embodiment of the invention, the cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest comprises a baseline-adjusted amino acid concentration, A , according to the formula $A = [(M * X) + (N * P) + (Y * M * X)] * F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass,

P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor.

[0016] Yet another aspect of the invention provides a cell culture medium, comprising a baseline-adjusted amino acid concentration, A' , according to the formula $A' = [(M * X) + (Y * M * X)] * F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, M is a multiplier for desired peak cell density of the cell culture, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor. In some embodiments, the cell culture medium is a large-scale cell culture medium. In other embodiments, the cell culture medium is an animal cell culture medium.

[0017] Yet another aspect of the invention provides a method for determining an optimized concentration of an amino acid used in a cell culture medium for the production of a polypeptide of interest in a cell culture, comprising: determining the amino acid concentration required for the cell mass of the cells in the cell culture at a target cell density; determining the amino acid concentration required to produce the polypeptide of interest in the cell culture at a target polypeptide titer; determining the amino acid concentration required for cell maintenance of the cells in the cell culture; and adding the concentrations to provide an optimized concentration of the amino acid used in the cell culture medium for the production of the polypeptide of interest in the cell culture.

[0018] A further aspect of the invention provides a method for determining an optimized amino acid concentration, A, of an amino acid used in a cell culture medium for the production of a polypeptide of interest in a cell culture, comprising: determining the amino acid concentration, X, required for cell mass of the cells at a set cell density; determining the amino acid concentration, P, required to produce the polypeptide of interest at a set polypeptide titer; and determining the optimized amino acid concentration, A, according to the formula $A = [(M * X) + (N * P) + (M * Y * X)] * F$, wherein M is a multiplier for a desired target cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired target concentration

of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor; and F is a baseline factor. In some embodiments of the methods for determining an optimized amino acid concentration, the cell culture is a large-scale cell culture. In other embodiments, the cells are animal cells.

[0019] Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] **Figure 1** depicts the cell density (Y-axis; "Cell Density (10^6 cells/mL)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in the rationally designed medium of Example 2.

[0021] **Figure 2** depicts the titer (Y-axis; "Titer (g/L)") of anti-IL-22 antibody over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in the rationally designed medium of Example 2.

[0022] **Figure 3** depicts the cell density (Y-axis; "Cell Density (10^6 cells/mL)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in the rationally designed medium of Example 3.

[0023] **Figure 4** depicts the titer (Y-axis; "Titer (g/L)") of anti-IL-22 antibody over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in the rationally designed medium of Example 3.

[0024] **Figure 5** depicts the titer (Y-axis; "Titer (g/L)") of anti-IL-22 antibody over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Traditional Medium" (a medium based on traditional cell culture requirements, see, e.g., U.S. Published Patent Application No. 2006/0121568), "Rational Design Medium" prepared using the methods herein, or "Traditional Medium + Proline," which contains an additional 3.7 mM proline added to the "Traditional Medium" (see Example 4).

[0025] **Figure 6** depicts the cell density (Y-axis; "Cell Density (10^6 cells/mL)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Traditional Medium," "Rational Design Medium," or "Traditional Medium + Proline" (see Example 4).

[0026] **Figure 7** depicts the cell viability (Y-axis; "Viability [%]") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Traditional Medium," "Rational Design Medium," or "Traditional Medium + Proline" (see Example 4).

[0027] **Figure 8** depicts the concentration of the designated amino acid (Y-axis; "[μ M]") ((**Figure 8A**) proline; (**Figure 8B**) threonine; (**Figure 8C**) valine; (**Figure 8D**) tryptophan; or (**Figure 8E**) tyrosine) over time (X-axis; "Days") for CHO cells for cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Traditional Medium," "Rational Design Medium," or "Traditional Medium + Proline" (see Example 4).

[0028] **Figure 9** depicts the cell density (Y-axis; "Cell Density (10^6 cells/mL)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Rational Design Medium" or "Rational Design Medium without maintenance and baseline factors." The figure is representative of 5 independent replicates (n=5) (see Example 6).

[0029] **Figure 10** depicts cell viability (Y-axis: "Viability (%)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Rational Design Medium" or "Rational Design Medium without maintenance and baseline factors." The figure is representative of 5 independent replicates (n=5) (see Example 6).

[0030] **Figure 11** depicts antibody titer (Y-axis; "Titer (g/L)") over time (X-axis; "Days") for CHO cells engineered to express anti-IL-22. Cells were cultured in "Rational Design Medium" or "Rational Design Medium without maintenance and baseline factors." The figure is representative of 5 independent replicates (n=5) (see Example 6).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0031] The term "batch culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which all the components that will ultimately be used in culturing the cells, including the medium as well as the cells themselves, are provided at the beginning of the culturing process. A batch culture is typically stopped at some

point and the cells and/or components in the medium are harvested and optionally purified.

[0032] The term "fed-batch culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which additional components are provided to the culture at some time subsequent to the beginning of the culture process. The provided components typically comprise nutritional supplements for the cells that have been depleted during the culturing process. A fed-batch culture is typically stopped at some point and the cells and/or components in the medium are harvested and optionally purified. In a preferred embodiment of the present invention, the cell culture is an animal cell culture, e.g., a mammalian cell culture, that is a batch or fed-batch culture.

[0033] The term "perfusion culture" as used herein refers to a method of culturing cells in which additional components are provided continuously or semi-continuously to the culture subsequent to the beginning of the culture process. The provided components typically comprise nutritional supplements for the cells that have been depleted during the culturing process. Portions of the cells and/or components in the medium are typically harvested on a continuous or semi-continuous basis and are optionally purified.

[0034] The term "bioreactor" as used herein refers to any vessel used for the growth of a prokaryotic or eukaryotic cell culture, e.g., an animal cell culture (such as a mammalian cell culture). The bioreactor can be of any size so long as it is useful for the culturing of cells, e.g., mammalian cells. Typically, the bioreactor will be at least 30 ml and may be 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,0000 liters or more, or any intermediate volume. The internal conditions of the bioreactor, including, but not limited to pH and temperature, are typically controlled during the culturing period. The bioreactor can be composed of any material that is suitable for holding mammalian cell cultures suspended in media under the culture conditions of the present invention, including glass, plastic or metal. The term "production bioreactor" as used herein refers to the final bioreactor used in the production of the polypeptide or protein of interest. The volume of a large-scale cell culture production bioreactor is generally greater than about 100 ml, typically at least about 10 liters, and may be

500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,0000 liters or more, or any intermediate volume. One of ordinary skill in the art will be aware of, and will be able to choose, suitable bioreactors for use in practicing the present invention.

[0035] The terms "cell density," "cell concentration," or the like, as used herein, refer to that number, weight, mass, etc. of cells present in a given volume of medium. "Peak cell density" or the like refers to the maximum number of cells that can be reached in a given volume of medium, and "desired peak cell density" or the like refers to the maximum number of cells that a practitioner desires to obtain (e.g., targets) in a given cell volume. Variations of such target value(s) will be clear to those of skill in the art, e.g., one of skill may express a target value(s) in terms of desired cell mass, and such target value(s) may be in one or more appropriate units of measure (e.g., desired peak units of cell mass).

[0036] The term "cell viability" as used herein refers to the ability of cells in culture to survive under a given set of culture conditions or experimental variations. The term as used herein also refers to that portion of cells that are alive at a particular time in relation to the total number of cells, living and dead, in the culture at that time.

[0037] The terms "culture" and "cell culture" as used herein refer to a cell population that is suspended in a cell culture medium under conditions suitable to survival and/or growth of the cell population. As used herein, these terms may refer to the combination comprising the cell population (e.g., the animal cell culture) and the medium in which the population is suspended.

[0038] The term "integrated viable cell density" or "IVC" as used herein refers to the average density of viable cells over the course of the culture multiplied by the amount of time the culture has run. Assuming the amount of polypeptide and/or protein produced is proportional to the number of viable cells present over the course of the culture, integrated viable cell density is a useful tool for estimating the amount of polypeptide and/or protein produced over the course of the culture.

[0039] The terms "medium," "cell culture medium," and "culture medium" as used herein refer to a solution containing nutrients that nourish growing animal, e.g., mammalian, cells. Typically, these solutions provide essential and

nonessential amino acids, vitamins, energy sources, lipids, and trace elements required by the cell for minimal growth and/or survival. The solution may also contain components that enhance growth and/or survival above the minimal rate, including hormones and growth factors. The solution is preferably formulated to a pH and salt concentration optimal for cell survival and proliferation. In one embodiment, the medium is a defined medium. Defined media are media in which all components have a known chemical structure. In another embodiment of the invention, the medium may contain an amino acid(s) derived from any source or method known in the art, including, but not limited to, an amino acid(s) derived either from single amino acid addition(s) or from peptone or protein hydrolysate (including animal or plant source(s)) addition(s).

[0040] The term "seeding" as used herein refers to the process of providing a cell culture to a bioreactor or another vessel. The cells may have been propagated previously in another bioreactor or vessel. Alternatively, the cells may have been frozen and thawed prior to, e.g., immediately prior to, providing them to the bioreactor or vessel. The term refers to any number of cells, including a single cell.

[0041] The term "titer" as used herein refers to the total amount of polypeptide of interest produced by an animal cell culture, divided by a given amount of medium volume; thus "titer" refers to a concentration. Titer is typically expressed in units of milligrams of polypeptide per milliliter of medium.

[0042] As used herein, the term "antibody" includes a protein comprising at least one, and typically two, VH domains or portions thereof, and/or at least one, and typically two, VL domains or portions thereof. In certain embodiments, the antibody is a tetramer of two heavy immunoglobulin chains and two light immunoglobulin chains, wherein the heavy and light immunoglobulin chains are interconnected by, e.g., disulfide bonds. The antibodies, or a portion thereof, can be obtained from any origin, including, but not limited to, rodent, primate (e.g., human and nonhuman primate), camelid, etc., or they can be recombinantly produced, e.g., chimeric, humanized, and/or *in vitro*-generated, e.g., by methods well known to those of skill in the art.

[0043] Examples of binding fragments encompassed within the term “antigen-binding fragment” of an antibody include, but are not limited to, (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment, which consists of a VH domain; (vi) a camelid or camelized heavy chain variable domain (VHH); (vii) a single chain Fv (scFv; see below); (viii) a bispecific antibody; and (ix) one or more fragments of an immunoglobulin molecule fused to an Fc region. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv)); see, e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term “antigen-binding fragment” of an antibody. These fragments may be obtained using conventional techniques known to those skilled in the art, and the fragments are evaluated for function in the same manner as are intact antibodies.

[0044] The “antigen-binding fragment” can, optionally, further include a moiety that enhances one or more of, e.g., stability, effector cell function or complement fixation. For example, the antigen binding fragment can further include a pegylated moiety, albumin, or a heavy and/or a light chain constant region.

[0045] Other than “bispecific” or “bifunctional” antibodies, an antibody is understood to have each of its binding sites identical. A “bispecific” or “bifunctional antibody” is an artificial hybrid antibody having two different heavy/light chain pairs and two different binding sites. Bispecific antibodies can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g., Songsivilai and Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-21; Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547-53.

[0046] The phrase “protein” or “protein product” refers to one or more chains of amino acids. As used herein, the term “protein” is synonymous with “polypeptide” and, as is generally understood in the art, refers to at least one chain of amino acids linked via sequential peptide bonds. In certain embodiments, a “protein of interest” or a “polypeptide of interest” is a protein encoded by an exogenous nucleic acid molecule that has been transformed into a host cell. In certain embodiments, wherein the “protein of interest” is coded for by an exogenous DNA with which the host cell has been transformed, the nucleic acid sequence of the exogenous DNA determines the sequence of amino acids. In certain embodiments, a “protein of interest” is a protein encoded by a nucleic acid molecule that is endogenous to the host cell. In certain embodiments, expression of such an endogenous protein of interest is altered by transfecting a host cell with an exogenous nucleic acid molecule that may, for example, contain one or more regulatory sequences and/or encode a protein that enhances expression of the protein of interest. Methods and compositions of the present invention may be used to produce any protein of interest, including, but not limited to proteins having pharmaceutical, diagnostic, agricultural, and/or any of a variety of other properties that are useful in commercial, experimental and/or other applications. In addition, a protein of interest can be a protein therapeutic. Namely, a protein therapeutic is a protein that has a biological effect on a region in the body on which it acts or on a region of the body on which it remotely acts via intermediates. Examples of protein therapeutics are discussed in more detail below. In certain embodiments, proteins produced using methods and/or compositions of the present invention may be processed and/or modified. For example, a protein to be produced in accordance with the present invention may be glycosylated.

[0047] The present invention may be used to culture cells for the advantageous production of any therapeutic protein, such as pharmaceutically or commercially relevant enzymes, receptors, antibodies (e.g., monoclonal and/or polyclonal antibodies), Fc fusion proteins, cytokines, hormones, regulatory factors, growth factors, coagulation/clotting factors, antigen binding agents, etc. One of ordinary skill in the art will be aware of other proteins that can be produced in accordance

with the present invention, and will be able to use methods disclosed herein to produce such proteins.

Expression Constructs and Generation of Recombinant Host Cells

[0048] The present invention uses recombinant host cells, e.g., prokaryotic or eukaryotic host cells, i.e., cells transfected with an expression construct containing a nucleic acid that encodes a polypeptide of interest. The phrase "animal cells" encompasses invertebrate, nonmammalian vertebrate (e.g., avian, reptile and amphibian), and mammalian cells. Nonlimiting examples of invertebrate cells include the following insect cells: *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* (silkworm / silk moth).

[0049] A number of mammalian cell lines are suitable host cells for recombinant expression of polypeptides of interest. Mammalian host cell lines include, for example, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L cells, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, Jurkat cells, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, murine myelomas (e.g., SP2/0 and NS0) and C2C12 cells, as well as transformed primate cell lines, hybridomas, normal diploid cells, and cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue and primary explants. Any eukaryotic cell that is capable of expressing the polypeptide of interest may be used in the disclosed media design methods. Numerous cell lines are available from commercial sources such as the American Type Culture Collection (ATCC). In one embodiment of the invention, the cell culture, e.g., the large-scale cell culture, employs hybridoma cells. The construction of antibody-producing hybridoma cells is well known in the art. In one embodiment of the invention, the cell culture, e.g., the large-scale cell culture, employs CHO cells.

[0050] Alternatively, it may be possible to recombinantly produce polypeptides of interest in lower eukaryotes such as yeast, or in prokaryotes such as bacteria. Suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida*, or any yeast strain capable of expressing polypeptide of interest. Suitable bacterial strains include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, or any bacterial strain capable of

expressing the polypeptide of interest. Expression in bacteria may result in formation of inclusion bodies incorporating the recombinant protein. Thus, refolding of the recombinant protein may be required in order to produce active or more active material. Several methods for obtaining correctly folded heterologous proteins from bacterial inclusion bodies are known in the art. These methods generally involve solubilizing the protein from the inclusion bodies, then denaturing the protein completely using a chaotropic agent. When cysteine residues are present in the primary amino acid sequence of the protein, it is often necessary to accomplish the refolding in an environment that allows correct formation of disulfide bonds (a redox system). General methods of refolding are disclosed in Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187-95, EP 0433225, and U.S. Patent No. 5,399,677.

[0051] The present invention uses constructs, in the form of plasmids, vectors, and transcription or expression cassettes, comprised of at least one polynucleotide encoding a polypeptide of interest. Vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operably linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" or "expression vectors." In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most common vector form. However, the invention is intended to include other forms of expression vectors that serve equivalent functions, including, but not limited to, viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, modified alphaviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses).

[0052] Constructs that are suitable for expression of proteins in animal cells are well known in the art. For example, polynucleotides may be operably linked to an expression control sequence such as those present in the pMT2 or pED expression vectors disclosed in, e.g., Kaufman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485-90. Other suitable expression control sequences are found in vectors known in the art and include, but are not limited to: HaloTag™ pHT2, pACT, pBIND, pCAT@3, pCI, phRG, phRL (Promega, Madison, WI); pcDNA3.1, pcDNA3.1-E, pcDNA4/HisMAX, pcDNA4/HisMAX-E, pcDNA3.1/Hygro,

pcDNA3.1/Zeo, pZeoSV2, pRc/CMV2, pBudCE4 pRc/RSV (Invitrogen, Carlsbad, CA); pCMV-3Tag Vectors, pCMV-Script® Vector, pCMV-Tag Vectors, pSG5 Vectors (Stratagene, La Jolla, CA); pDNR-Dual, pDNR-CMV (Clontech, Palo Alto, CA); and pSMEDA (Wyeth, Madison, WI). General methods of expressing recombinant proteins are also known and are exemplified in, e.g., Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:537-66.

[0053] As defined herein “operably linked” means enzymatically or chemically ligated to form a covalent bond between the polynucleotide to be expressed and the expression control sequence in a manner that the encoded protein is expressed by the transfected host cell.

[0054] The recombinant expression constructs of the invention may carry additional sequences, such as regulatory sequences (e.g., sequences that regulate either vector replication (e.g., origins of replication, transcription of the nucleic acid sequence encoding the polypeptide (or peptide) of interest) or expression of the encoded polypeptide), tag sequences such as histidine, and selectable marker genes. The term “regulatory sequence” is intended to include promoters, enhancers and any other expression control elements (e.g., polyadenylation signals, transcription splice sites) that control transcription, replication or translation. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Those skilled in the art will recognize that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, will depend on various factors, including choice of the host cell and the level of protein expression desired. Preferred regulatory sequences for expression of proteins in mammalian host cells include viral elements that direct high levels of protein expression, such as promoters and/or enhancers derived from the FF-1a promoter and BGH poly A, cytomegalovirus (CMV) (e.g., the CMV promoter/enhancer), Simian virus 40 (SV40) (e.g., the SV40 promoter/enhancer), adenovirus (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), and polyoma. Viral regulatory elements, and sequences thereof, are described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,168,062; 4,510,245; and 4,968,615, all of which are incorporated by reference herein in their entireties.

[0055] Suitable vectors, containing appropriate regulatory sequences, including promoter sequences, terminator sequences, polyadenylation sequences, enhancer sequences, marker genes and other sequences as appropriate, may be either chosen or constructed. Inducible expression of proteins, achieved by using vectors with inducible promoter sequences, such as tetracycline-inducible vectors, e.g., pTet-On™ and pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA), may also be used in the disclosed method. For further details regarding expression vectors, see, for example, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2nd ed.) eds. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989). Many known techniques and protocols for manipulation of nucleic acids, for example, in preparation of nucleic acid constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells, gene expression, and analysis of proteins, are also described in detail in *Current Protocols in Molecular Biology* (2nd ed.) eds. Ausubel et al., Wiley & Sons, Alameda, CA (1992).

[0056] A polynucleotide inserted into an expression construct for producing a polypeptide of interest may encode any polypeptide that is capable of being expressed in the host cell used in the cell culture. Thus, the polynucleotide may encode full-length gene products, portions of full-length genes, peptides, or fusion proteins. Such polynucleotides may consist of genomic DNA or cDNA, and may be derived from any animal. Polynucleotides may be isolated from cells or organisms by methods well known in the art, e.g., PCR or RT-PCR, or may be produced by known conventional chemical synthesis methods. Such chemically synthetic polynucleotides may possess biological properties in common with natural polynucleotides, and thus may be employed as substitutes for natural polynucleotides.

[0057] Polypeptides may also be recombinantly produced by operably linking the polynucleotide encoding the polypeptide of interest to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, such as baculovirus vectors, and employing an insect cell expression system. Materials and methods for baculovirus/Sf9 expression systems are commercially available in kit form (e.g., the MAXBAC® kit, Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0058] Transfection of host cells, e.g., animal cells, with the expression construct may be achieved by numerous methods that are well known in the art. Cells may be either transiently transfected or stably transfected. Several different well-established methods exist for the delivery of molecules, particularly nucleic acids, into host cells, e.g., animal cells. Depending on the cell type, the desired transfection (i.e., transient or stable), and the specific experimental requirements, such as transfection of difficult cell lines or primary cells, the type of molecule transfected (genomic DNA, DNA, oligonucleotides), or the expression construct chosen, each transfer method possesses advantages and disadvantages known to those of skill in the art. Common transfection methods include, e.g., calcium phosphate precipitation, liposome mediated transfection, DEAE Dextran-mediated transfection, gene guns, electroporation, nanoparticle delivery, polyamines, episomes, and polyethylenimines. In addition, numerous transfection kits and reagents are commercially available from companies such as Invitrogen (VOYAGER™, LIPOFECTIN®), EMD Biosciences, San Diego, CA (GENEJUICE™), Qiagen, Germantown, MD (SUPERFECT™), Orbigen, San Diego, CA (SAPPHIRE™), and many others known to those of skill in the art. Transfection protocols may also be found in *Basic Methods in Molecular Biology* (2nd ed.) eds. Davis et al., Appleton and Lange, CT (1994).

[0059] The present invention uses cell cultures, e.g., large-scale animal cell cultures, to produce large quantities of the polypeptide of interest. Methods for large-scale transient transfections are disclosed in *Large-scale Mammalian Cell Culture Technology* (Biotechnology and Bioprocessing Series) ed. Lubiniecki, Marcel Dekker, NY (1990); Kunaparaju et al. (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 91:670-77; Maiorella et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1406-10; Baldi et al., *supra*; Lan Pham et al., *supra*; Meissner et al., *supra*; Durocher et al., *supra*). In general, large-scale transient gene expression in mammalian cell cultures may employ any one of several common types of transfection modes, e.g., polyethylenimine, electric field pulse, CALFECTION™ or calcium phosphate, to achieve high transfection efficiency at desired scales or volumes, e.g., greater than 10 liters (Derouazi et al., *supra*; Rols et al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206(1):115-21; Wurm and Bernard (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(2):156-59;

Schlaeger and Christensen (1999) *Cytotechnology* 30(1-3):71-83; Jordan et al. (1998) *Cytotechnology* 26(1):39-47; Lindell et al. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1676(2):155-61). These large-scale cultures are generally grown in bioreactors, shakers, or incubators with stir plates, and may also be known as "spinner" or "suspension" cultures. Thus, as opposed to traditional transfections, in which cells are attached to plates or flasks, the disclosed methods generally use suspension cultures. Large-scale cell cultures are generally considered to be cell cultures that have a volume of greater than about 100 ml.

[0060] In some instances, cell lines expressing the polypeptide of interest may be first produced and then used to seed a large-scale cell culture. Stable cell lines that express a protein of interest may be produced by various well-known methods, including the methods used for transient transfection disclosed herein. In general, stable cell lines are produced by long-term growth and selection in a chemically defined media. For example, cells transfected (e.g., by calcium phosphate precipitation, or liposomal transfection) with a nucleic acid that encodes a polypeptide of interest may concomitantly be transfected with a vector carrying a neomycin resistance gene, which confers resistance to neomycin/geneticin (G418). The transfected cells are then grown in G418-containing media, and the surviving cells clonally expanded to produce a stably expressing cell line. Aliquots of this cell line may then be used to seed a large-scale culture and to produce large quantities of the protein of interest.

[0061] Transfecting cells requires the optimization of several variables, including cell-seeding density (e.g., about 1×10^5 to about 3×10^6 cells/ml culture), serum concentration (e.g., 0–10%), incubation temperature (e.g., about 20–38°C), transfection vehicle or reagent (chemical or electric), culture volume (e.g., about 5 ml–20 liters), and incubation time (e.g., about 24–144 hours). For each cell type, optimal parameters will vary. However, commercial suppliers generally provide optimization guidelines for transfecting particular cell types, as do various references known to those of skill in the art that utilize transfection of the host cell chosen. These sources may be used to direct transfection of the chosen host cell, or may be used as a starting point from which simple trial and error may be used to provide optimum transfection parameters.

Cell Culture

[0062] Typical procedures for producing a polypeptide of interest include batch cultures and fed-batch cultures. Batch culture processes traditionally comprise inoculating a large-scale production culture with a seed culture of a particular cell density, growing the cells under conditions conducive to cell growth and viability, harvesting the culture when the cells reach a specified cell density, and purifying the expressed polypeptide. Fed-batch culture procedures include an additional step or steps of supplementing the batch culture with nutrients and other components that are consumed during the growth of the cells. One of ordinary skill in the art will recognize that the present invention can be employed in any system in which cells are cultured including, but not limited to, batch, fed-batch and perfusion systems. In certain preferred embodiments of the present invention, the cells are grown in fed-batch systems.

[0063] A persistent and unsolved problem with traditional cultures, e.g., batch and fed-batch cultures, is the production of metabolic waste products, which have detrimental effects on cell growth, viability, and production of expressed polypeptides. Two metabolic waste products that have particularly detrimental effects are lactate and ammonium, which are produced as a result of glucose and glutamine metabolism, respectively. In addition to the enzymatic production of ammonium as a result of glutamine metabolism, ammonium also accumulates in cell cultures as a result of nonmetabolic degradation over time.

[0064] Traditional media formulations, including commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ([DMEM], Sigma), contain relatively high levels of glucose and glutamine (the latter in comparison to other amino acids). Previously, these components were believed to be required in abundance since they are the primary metabolic energy sources for the cells. However, rapid consumption of these nutrients leads to the accumulation of lactate and ammonium as described above. Additionally, high initial levels of glucose and glutamine, and the subsequent accumulation of lactate and ammonium, result in high osmolarity, a condition that by itself is often detrimental to cell growth, cell viability and the production of polypeptides.

The rationally designed medium disclosed herein may be modified to decrease the accumulation of harmful metabolic products. Such modifications may be found in, e.g., U.S. Published Patent Application Nos. 2005/0070013 (restricted glucose feeding) and 2006/0121568 (modifications of amino acid content and ratios) (both of which are hereby incorporated by reference herein in their entireties).

Rational Media Design and Formulations

[0065] Traditional media formulations begin with a relatively low level of total amino acids in comparison with the media formulations of the present invention. For example, DME-F12 (a 50:50 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's medium and Ham's F12 medium) has a total amino acid content of 7.29 mM, and the traditional cell culture medium known as RPMI-1640 has a total amino acid content of 6.44 mM (see e.g., Morton (1970) *In Vitro* 6:89-108; Ham (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53:288-93; Moore et al. (1967) *J. Am. Medical Assn.* 199:519-24, all incorporated by reference herein). More recent media formulations (such as the media disclosed in U.S. Published Patent Application No. 2006/0121568) contain higher levels of amino acids and nutrients. Traditional formulations, however, are not based on actual calculated cell requirements, which include cell growth, cell maintenance, and, for cell cultures used to produce recombinant polypeptides, production requirements. Using these variables, provided herein are methods of determining media formulations with much higher, and yet nontoxic, concentrations of total amino acids.

[0066] The cell culture media formulations, e.g., the large-scale cell culture media formulations, described herein, when used in accordance with, e.g., other culturing steps described herein, and with, e.g., modifications such as those found in, e.g., U.S. Published Patent Application No. 2006/0121568, optimize cell density and polypeptide titer. An amino acid concentration of the media formulations described herein is based on the concentration of the amino acid(s) required for: 1) cell mass; 2) cell maintenance; and 3) polypeptide production. In one embodiment of the invention, a cell culture medium contains a concentration of the amino acid(s) that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid(s) that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration

of the amino acid(s) that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest. In another embodiment of the invention, a cell culture medium contains a concentration, A, of an amino acid that is represented by the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is the concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is the concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is the multiplier for the desired cell mass (i.e., the desired peak units of cell mass), N is the multiplier for the desired concentration of the polypeptide of interest (i.e., desired or target polypeptide titer), Y is the cell maintenance factor; and F is the baseline factor.

[0067] The concentration, P, of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer in the formula above is based on the primary structure of the recombinant protein, i.e., the amino acid content of the polypeptide. Thus, P will vary based on the polypeptide of interest that is to be produced by the large-scale cell culture. P may then be converted to the amino acid requirement for the target concentration of the polypeptide of interest using N, the multiplier for the desired concentration of the polypeptide of interest (i.e., desired or target polypeptide titer). In some representative examples of the invention below, the basic unit of polypeptide titer is 1 g/L. In Table 1, below, which contains a representative calculation using the formula supplied herein, the amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the polypeptide of interest at a titer of 10 g/L (column 4) is determined by multiplying the concentration, P, of the amino acid required for 1 g/L (column 2) by the multiplier, N, wherein $N=10$.

Table 1: Representative Determination of Baseline-Adjusted Amino Acid Concentration Required For Target Titer of 10 g/L Antibody at a Desired Cell Mass, Where Desired Cell Mass Is Represented by Desired Peak Cell Density of 15×10^6 cells/ml

1	2 (P)	3 (X)	4 (P x N)	5 (X x M)	6 (X x M x Y)	7	8 (A) (Column 7 x F)
Amino Acid (AA)	AA Concentration Required For Initial Antibody Titer of 1 g/L	AA Concentration Required for Cell Mass Represented by Cell Density of 10^6 cells/ml	Total AA Concentration Required for Target Antibody Titer of 10 g/L (N=10)	Total AA Concentration Required for Desired Peak Cell Density of 15×10^6 cells/ml (M=15)	Total AA Concentration Required for Cell Maintenance (Y=100%) or (Y=1)	Calculated Total AA Concentration Required for Target Antibody Titer and Desired Peak Cell Density	Baseline-Adjusted AA Concentration Required for Target Antibody Titer and Desired Peak Cell Density (F=1.3)
			Column 2 x 10	Column 3 x 15	Column 5 x 100%	(Column 4+5+6)	Column 7 x 1.3
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
ALA	0.41	0.30	4.08	4.56	4.56	13.20	17.17
ARG	0.17	0.16	1.73	2.38	2.38	6.50	8.45
ASN	0.26	0.15	2.62	2.23	2.23	7.08	9.21
ASP	0.29	0.29	2.87	4.36	4.36	11.59	15.07
CYS	0.19	0.09	1.88	1.42	1.42	4.73	6.14
GLU	0.40	0.16	4.00	2.33	2.33	8.67	11.26
GLN	0.39	0.29	3.87	4.40	4.40	12.67	16.47
GLY	0.47	0.25	4.72	3.80	3.80	12.33	16.02
HIS	0.16	0.07	1.59	1.07	1.07	3.72	4.83
ILE	0.14	0.16	1.43	2.33	2.33	6.10	7.93
LEU	0.49	0.25	4.88	3.80	3.80	12.49	16.24
LYS	0.52	0.24	5.20	3.55	3.55	12.31	16.00
MET	0.10	0.06	0.97	0.86	0.86	2.69	3.50
PHE	0.23	0.12	2.34	1.78	1.78	5.89	7.65
PRO	0.59	0.16	5.94	2.33	2.33	10.61	13.79
SER	0.97	0.34	9.73	5.11	5.11	19.96	25.94
THR	0.68	0.20	6.80	3.04	3.04	12.88	16.75
TRP	0.16	0.04	1.64	0.56	0.56	2.75	3.58
TYR	0.35	0.12	3.48	1.78	1.78	7.03	9.14
VAL	0.74	0.23	7.36	3.50	3.50	14.36	18.67
Total (mM)	7.71	3.68	77.13	55.21	55.21	187.55	243.82

[0068] The multiplier N may be calculated, e.g., by multiplying the integrated viable cell density (IVC) by the specific productivity (qp) of a particular cell line (N=IVC*qp). For example, if the seed density of a particular cell line is 0.8×10^6 cells/ml, the cell density at day 6 and day 10 is 15×10^6 cells/ml, and the cell

density at day 18 is 11×10^6 cells/ml (i.e., 73% of the value at days 6 and 15), then the $IVC = 211 \times 10^6$ (cells/ml)*day (i.e., $[(0.8+15)/2]*6$ days + $[(15+15)/2]*4$ days + $[(15+11)/2]*8$ days). If the average specific productivity (qp) of the chosen cell line is, e.g., $47 \mu\text{g}/10^6$ cells/day, then $N=10$ g/L at day 18 (i.e., 211×10^6 (cells/ml)*day x $47 \mu\text{g}/10^6$ cells/day). One of skill in the art will realize that these calculations may be performed with any cell line, or that N may be estimated based on cell characteristics and origin. Alternatively, the multiplier N need not be calculated from IVC and qp, and may simply be a reasonable target titer for a particular cell culture. A prophetic example, describing the calculation of IVC and qp, and the further selection of reasonable N and M values, is provided as Example 5 (below).

[0069] As used herein, "cell mass," "cell density," and the like refer to a collection of cells. For example, a cell mass can refer to a cell pellet. As used herein, "desired cell mass" and the like refers to a collection of cells, e.g., a cell pellet, that a practitioner desires to obtain in a cell culture. As used herein, "unit of cell mass" and the like reflects a number of ways of representing cell mass, e.g., cell number, cell density, cell volume, packed cell volume, dry cell weight, etc. One skilled in the art will know which is the most convenient or appropriate way of representing a unit of cell mass, etc., for a particular experimental condition. One skilled in the art will also understand that, depending on the unit of cell mass, M, the multiplier for desired cell mass, i.e., the desired peak units of cell mass, will be represented by either desired peak cell numbers, desired peak cell density, desired peak cell volume, desired peak packed cell volume, desired peak dry weight, etc.

[0070] In one embodiment of the invention, the unit of cell mass is represented by cell density and the desired cell mass is represented by desired peak cell density. In another embodiment, the unit of cell mass is represented by dry cell weight or mass. The dehydrated cell mass consists essentially of all proteins, carbohydrates, lipids, and nucleic acids present in that cell mass. Thus, the concentration, X, of an amino acid can be determined experimentally, by first spinning a known number of cells to a cell pellet, drying the cell pellet, and subsequently exposing the dried pellet to acid-hydrolysis, thereby lysing the

cellular proteins of the cell pellet to individual amino acids, which may then be quantified by an amino acid analyzer (see, e.g., Example 1). This provides the amino acid concentration, X, of a given number of cells, which may then be converted to the amino acid requirement for the desired peak cell density using M, the multiplier for the desired peak cell density. In **Table 1**, the total amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the desired peak cell density of 15×10^6 cells/ml (column 5) is determined by multiplying the concentration, X, of the amino acid required for 10^6 cells/ml (column 3) by the multiplier, M, wherein $M=15$. Thus, in some representative examples of the invention, the unit of cell mass is 10^6 cells/ml. Alternatively, e.g., for an amino acid known to be susceptible to degradation, the concentration, X, of the amino acid that is used in the formula above may be determined from literature values, e.g., Nyberg et al. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-35; Nadeau et al. (2000) *Metab. Eng.* 2:277-92; and Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318, or the methods disclosed in such publications or similar publications known in the art.

[0071] When the multiplier M for desired cell mass is represented desired peak cell density, M may be chosen as, e.g., the peak density of a particular cell line, by the density at which the productivity of the cell line is maximized, or by the predicted density for the cell line at a particular time period based on the specific growth rate.

[0072] The amino acid concentration of the cell culture medium that is required for cell maintenance, Y, is a percentage of the amino acid concentration required for the desired cell mass, e.g., desired peak cell density. In one embodiment of the invention, the maintenance requirement ranges from 0% to 300% of the desired cell mass requirement, which provides sufficient nutrients for cell use without risk of nutrient-induced toxicity. In another embodiment of the invention, the maintenance requirement ranges from 0% to 150% of the desired cell mass requirement, which provides sufficient nutrients for cell use without risk of nutrient-induced toxicity. The maintenance requirement increases as culture duration increases (e.g., 100-150% maintenance for a 21 day culture). In **Table 1**, the amino acid concentration of the cell culture medium that is required

for cell maintenance (column 6) is determined by multiplying the amino acid concentration required for the desired peak cell density (column 5) by the cell maintenance factor, Y, which in this representative example is 100%, in order to allow an extended culture period. The maintenance factor, Y, will differ for different cells (and different cell lines) depending on the unique metabolic demands of the cells in culture. Further, the maintenance requirements for cells in culture will also differ due to the variability in processes, e.g., inoculation density, culture duration, time of temperature shift, etc. As an initial guideline, one may provide, e.g., 0% maintenance (daily) for cultures at days 0 to 5, 3% to 5% maintenance (daily) for cultures at days 6 to 10, and 7% to 10% maintenance (daily) for cultures at days 11 to 21. For a process greater than 21 days, cultures may be provided 2% to 5% maintenance (daily) for those additional days. One of ordinary skill in the art will realize that adjusting the maintenance factor, Y, to optimize density and titer, is merely a matter of routine trial and error. Adjusting amino acid concentration according to the cell maintenance requirement is important for increased viability and productivity of the cell culture, and thus is an important aspect of the present invention. For example, adjusting amino acid concentration according to the cell maintenance requirement enables the cell culture to sustain greater cell density, cell viability, and to produce higher polypeptide titer (see, e.g., Example 6).

[0073] Once the amino acid requirements of desired: 1) cell mass (column 5); 2) cell maintenance (column 6); and 3) polypeptide production for the target titer (column 4) are determined, the calculated total amino acid concentration of the target cell culture may be obtained. In **Table 1**, the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the target cell culture (column 7), is determined by adding the amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the polypeptide of interest at a titer of 10 g/L (column 4), the amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the desired peak cell density of 15×10^6 cells/ml (column 5), and the amino acid concentration of the cell culture medium that is required for a selected level of cell maintenance (column 6).

[0074] Once the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium that is required for the target cell culture is obtained as described above, the value is adjusted to a desired cell culture medium amino acid concentration, A, by a baseline factor, F, which allows for the driving force of amino transfer, e.g., the extra amino acids required for mass transfer, the extra amino acids required to drive transport across cell membrane, etc. This adjusted value, A, is referred to herein as the “baseline-adjusted amino acid concentration” or “optimized concentration.” The baseline-adjusted amino acid concentration, A, represents the cumulative total amount of an amino acid(s) that will be delivered to the culture, expressed relative to the final volume of the culture, which includes the volume of the starting medium, plus the volume of any feeds for perfusion or fed-batch culture(s). Adjusting the total amino acid concentration to the baseline-adjusted amino acid concentration is an important aspect of the invention because it allows higher cell viability, cell density, and polypeptide titers (see, e.g., Example 6).

[0075] The baseline factor, F, which increases the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium by up to 200%, ranges from 1 (0% increase) to 3 (200% increase). In one embodiment of the invention, the range for F is between 1 and 1.5. In another embodiment of the invention, a value of F below 1 may be offset by modifying the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium (**Table 1**, column 7), which may be achieved by modifying the amino acid concentration required for desired cell mass, the amino acid concentration required for cell maintenance, and/or the amino acid concentration required for incorporation into the polypeptide of interest. For example, a baseline factor of 0.5 may be offset by increasing the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium by, e.g., a factor of two (or more), which may be achieved by varying M, X, N, P and/or Y. In **Table 1**, the baseline-adjusted amino acid concentration, A, of the cell culture medium that is required for the target titer and desired peak cell density (column 8), is determined by multiplying the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium (column 7), by the baseline factor, F, which in the

representative example of **Table 1** is 1.3 (corresponding to a 30% increase over the calculated total amino acid concentration of the cell culture medium).

[0076] Medium containing the baseline-adjusted concentration, A, of an amino acid is referred to herein as the “desired cell culture medium.” Thus, the “desired cell culture medium” represents a goal medium that contains the baseline-adjusted concentration, A. This medium comprises at least one amino acid concentration determined by the above formula. Preferably the desired cell culture medium contains more than one amino acid concentration determined by the above formula. More preferably, the desired cell culture medium contains at least twelve adjusted amino acid concentrations, e.g., an adjusted concentration of arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, and valine, determined by the above formula. It will be understood by one of skill in the art that the baseline-adjusted amino acid concentration, A, in the desired cell culture medium may be achieved by any number of means, including, but not limited to, individually adding the amino acid(s), adding peptone or other protein hydrolysates, and/or by adding another concentrated cell culture medium (e.g., a feeding cell culture medium (or medium mix, e.g., a medium powder)) to a starting cell culture medium (or starting cell culture medium mix, e.g., a medium powder). One of skill in the art will understand that the addition of peptone (or other protein hydrolysate) may be directed by the amino acid contents of the particular peptone product of choice, or by determining the amino acid concentration provided by a particular peptone, e.g., in general, 5 g/L peptone provides a concentration of about 40 mM to about 50 mM total amino acids.

[0077] The amino acid concentration in the desired cell culture medium is based on at least one baseline-adjusted amino acid concentration, A, determined by the inventive formula disclosed herein; however, that concentration, as well as other concentrations of amino acids in the desired cell culture medium, may be varied from the baseline-adjusted amino acid concentration(s) due to the influence of several factors. For example, certain amino acids may be produced during culturing, and thus may be kept at a low level. Other amino acids may be varied based on published values (see, e.g., U.S. Published Patent Application

No. 2006/0121568). Further, some amino acids, e.g., methionine, may be consumed at a greater rate by particular cell types, and thus should be added in excess. Yet other amino acids, such as proline, provide a driving force for cell growth and polypeptide production (see Example 4), and these amino acids should be provided, in some cases, at a greater amount than determined by the above inventive formula. In addition, one may modify the baseline-adjusted amino acid concentration if the concentration obtained using the above formula is considered to be toxic (e.g., consideration of the levels of serine, tyrosine, methionine and valine). It is within the knowledge of one of skill in the art, upon obtaining the baseline-adjusted amino acid concentration, A, of an amino acid(s) for use in the desired cell culture medium, to vary the baseline-adjusted amino acid concentration based on factors such as those noted herein.

[0078] Additional media components, for example, vitamins, salts, glucose, elements, may be calculated from (or based on) various sources, e.g., U.S. Published Patent Application Nos. 2005/0070013 and 2006/0121568. Further, the baseline-adjusted amino acid concentration, A, of an amino acid obtained using the above formula may be modified to provide a particular ratio in relation to another amino acid (e.g., the ratio of glutamine to asparagine) or to fall within a desired combined concentration (e.g., the combined concentration of glutamine and asparagine). For example, it is known that a high asparagine, low glutamine medium, combined with temperature shift, enables uptake of lactate, thereby detoxifying a cell culture (U.S. Published Patent Application No. 2006/0121568). Thus, one may wish to modify the baseline-adjusted concentration, A, of glutamine and/or asparagine, in order to obtain an optimum ratio.

[0079] It will be noted from the representative example in **Table 1** that the combined concentration of the baseline-adjusted amino acid concentrations for use in the desired cell culture medium is high, i.e., over 243 mM. Thus, disclosed herein is the finding that a high concentration of amino acids may be used in a desired cell culture medium without toxicity or titer detriment if that concentration is based upon the calculated amino acid requirements for a target cell density and polypeptide titer. In one embodiment of the invention, the combined concentration of amino acids in the desired cell culture medium is

between about 120 mM and about 250 mM. In other embodiments, the combined concentration of amino acids in the desired cell culture medium is greater than about 250 mM, e.g., about 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 or 510 mM, or any intermediate value.

[0080] The above-identified baseline-adjusted concentration, A, of an amino acid that is used in a desired cell culture medium, may be used in batch, fed-batch, and perfusion cultures. When used in batch culture, the initial concentration of the amino acid used in the desired cell culture medium is the baseline-adjusted amino acid concentration, A. When used in fed-batch or perfusion cultures, the baseline-adjusted amino acid concentration, A, represents the cumulative total amount of an amino acid(s) that will be delivered to the culture, which includes the volume of the starting medium plus the volume of all feeds. Thus, for fed-batch cultures, which use either continuous feeds (e.g., feeds on days 3-21) or periodic feeds (e.g., feeds every 2-3 days), the starting medium is engineered to contain a starting concentration of the amino acid, B, according to the formula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, wherein Z is the concentration of the amino acid in the feeding cell culture medium, and V is the volume of the feeding culture medium as a proportion of the desired cell culture medium volume. A representative example of the calculations required to obtain the starting amino acid concentration, B, is provided in **Table 2**, below. In **Table 2**, some baseline-adjusted amino acid concentrations, A (column 2), are converted to the starting media amino acid concentration, B (column 5), based on a 17% feed volume ($V=17\%$), and the feeding medium amino acid concentration, Z (column 4). In this example, several baseline-adjusted amino acid concentrations, A (column 2), and starting amino acid concentrations, B (column 5), are modified to the values shown in bold in columns 3 and 6. Modification of asparagine, aspartic acid, glutamine, and cysteine concentrations was based on the concentrations suggested by U.S. Published Patent Application No. 2006/0121568; methionine was adjusted by 50% to compensate for its consumption at a higher amount than predicted; alanine, glutamic acid and glycine are produced by the cultures (and thus kept at a low level); and serine, tyrosine, and valine concentrations were

decreased to nontoxic levels. It will therefore be understood that the starting amino acid concentration, B, may be based on either the baseline-adjusted amino acid concentration, A, or on the modified baseline-adjusted amino acid concentration.

[0081] One of skill in the art will appreciate that the feeding medium used to obtain the desired cell culture medium during fed-batch and perfusion cell culturing should be as highly concentrated as possible in order to avoid overflow in the container in which the culture is carried out (e.g., a bioreactor or shaker flask) and to avoid diluting the media components. In the example set forth in **Table 2**, a preferred feeding media is denoted "Feed Medium," and the amino acid concentrations, Z, of the Feed Medium are set forth in column 4. However, any highly concentrated feeding medium, or any method of providing highly concentrated amino acids to the starting cell culture medium may be used, as long as the desired baseline-adjusted amino acid concentration, A, will be achieved in the target volume. Such methods of providing highly concentrated amino acids to a cell culture are commonly used and well known to one of skill in the art.

[0082] It will be understood by one of skill in the art that the starting concentration of the amino acid, B, in the starting cell culture medium may be achieved by any number of means, including, but not limited to, individually adding the amino acid(s), adding peptone and/or other protein hydrolysate, and/or adding another concentrated culture medium (or medium mix, e.g., a medium powder) to the starting cell culture medium (or starting cell culture medium mix, e.g., a medium powder). It will also be understood by one of skill in the art that the concentration of the amino acid, Z, in the feeding cell culture medium may be achieved by any number of means, including, but not limited to, individually adding the amino acid(s), adding peptone and/or other protein hydrolysate, and/or adding another concentrated culture medium (or medium mix, e.g., a medium powder) to the feeding cell culture medium (or feeding cell culture medium mix, e.g., a medium powder).

[0083] It will be noted from the representative example in **Table 2** that the combined concentration of amino acids for use in the starting cell culture medium is high, i.e., over 125 mM. Thus, disclosed herein is the finding that a high

concentration of amino acids may be used without toxicity or titer detriment in a starting cell culture medium if the starting amino acid concentration is based upon the calculated amino acid requirements for a desired peak cell density and a desired polypeptide titer. In one embodiment of the invention, the combined concentration of amino acids is between about 70 mM and about 510 mM. In one embodiment of the invention, the combined concentration of amino acids is between about 120 mM and about 350 mM. In another embodiment of the invention, the combined concentration of amino acids in the starting cell culture medium is between about 70 mM and about 140 mM. In another embodiment of the invention, the combined concentration of amino acids in the starting cell culture medium is greater than about 140 mM.

Table 2: Representative Determination of Starting Amino Acid Concentration For A Target Titer of 10 g/L Antibody, a Desired Peak Cell Density of 15×10^6 cells/ml, and a 17% Feed

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Amino Acid (AA)	Baseline-Adjusted AA Concentration Required for Target Titer and Desired Peak Cell Density	Modification of Baseline-Adjusted AA Concentration Required for Target Titer and Desired Peak Cell Density	Feed Medium AA Concentration	Starting AA Concentration Required For Target Titer and Desired Peak Cell Density (V=17%)	Modified Starting AA Concentration Required For Target Titer and Desired Peak Cell Density
	mM	mM	mM	mM	mM
ALA	17.17	0.20	6.4	-1.07	0.2
ARG	8.45	8.45	35.13	2.99	2.99
ASN	9.21	24.00	56	17.45	17.45
ASP	15.07	1.70	16	-1.23	1.7
CYS	6.14	0.40	0	0.48	0.4
GLU	11.26	0.20	6.4	-1.07	0.2
GLN	16.47	4.00	0	4.82	4.2
GLY	16.02	4.00	6.4	3.51	3.51
HIS	4.83	4.83	11.2	3.53	3.53
ILE	7.93	7.93	28.82	3.65	3.65
LEU	16.24	16.24	41.53	11.06	11.06
LYS	16.00	16.00	32	12.72	12.72
MET	3.50	5.25	12.8	3.71	3.71
PHE	7.65	7.65	16	5.94	5.94
PRO	13.79	13.79	19.2	12.68	12.68
SER	25.94	25.94	48.15	21.39	10.2
THR	16.75	16.75	25.6	14.94	14.94
TRP	3.58	3.58	5.11	3.27	3.27
TYR	9.14	9.14	12.75	8.40	5.2
VAL	18.67	18.67	25.6	17.25	10.2
Total (mM)	243.82		405.09		127.73

[0084] As shown in Table 3A and Table 3B, the determination of the baseline-adjusted amino acid concentration of an amino acid, A, used in a desired cell culture medium, and the determination of the starting amino acid concentration, B, used in the starting cell culture medium, may be calculated for any desired target polypeptide titer and desired peak (target) cell density. The desired peak cell density of the large-scale culture ranges from about 3 to about

40 x 10⁶ cells/mL for fed-batch culture. In one embodiment of the invention, the desired peak cell density ranges from about 5 to about 20 x 10⁶ cells/mL. The target titer of the large-scale culture ranges from about 3 to about 25 g/L. In yet another embodiment of the invention, the target titer of the large-scale culture ranges from about 5 to about 20 g/L. For example, in **Table 3**, desired peak cell density ranges from 10 to 15 x 10⁶ cells/mL, and target titer varies from 3 to 10 g/L.

Table 3A: Representative Examples of Baseline-Adjusted Amino Acid Concentrations, A, for Various Target Titers (As Represented by a Multiplier for Target Polypeptide Titer, N) and Desired Peak Cell Densities (As Represented by a Multiplier for Desired Peak Cell Density, M).

A	N=10 M= 15	N=5 M=12.5	N=3 M=10
Amino Acid Concentration	mM	mM	mM
ALA	17.2	12.5	9.50
ARG	8.5	6.3	4.81
ASN	9.2	6.5	4.89
ASP	15.1	11.3	8.68
CYS	6.1	4.3	3.20
GLU	11.3	7.7	5.60
GLN	16.5	12.1	9.14
GLY	16.0	11.3	8.43
HIS	4.8	3.3	2.46
ILE	7.9	6.0	4.60
LEU	16.2	11.4	8.50
LYS	16.0	11.1	8.18
MET	3.5	2.5	1.87
PHE	7.7	5.4	3.99
PRO	13.8	8.9	6.36
SER	25.9	17.4	12.66
THR	16.8	11.0	7.93
TRP	3.6	2.3	1.61
TYR	9.1	6.1	4.43
VAL	18.7	12.4	8.94
Total	243.8	169.8	125.8

Table 3B: Representative Examples of Starting Media Amino Acid Concentrations, B, for Various Target Titers (As Represented by a Multiplier for Target Polypeptide Titer, N) and Desired Peak Cell Densities (As Represented by a Multiplier for Desired Peak Cell Density, M); Starting Media Amino Acid Concentrations Were Determined by Subtracting Feed and Other Modifications from Baseline-Adjusted Amino Acid Concentrations

B	N=10 M=15	N=5 M=12.5	N=3 M=10
Amino Acid Concentration	mM	mM	mM
ALA	0.2	0.2	0.20
ARG	3.0	1.9	1.68
ASN	17.4	14.6	10.77
ASP	1.7	1.7	1.70
CYS	0.4	0.4	0.40
GLU	0.2	0.2	0.20
GLN	4.0	4.0	4.00
GLY	3.5	3.6	3.75
HIS	3.5	2.2	1.56
ILE	3.6	2.5	2.10
LEU	11.1	6.9	5.09
LYS	12.7	7.9	5.73
MET	3.7	2.4	1.78
PHE	5.9	3.8	2.75
PRO	12.7	7.4	5.04
SER	10.2	10.2	9.00
THR	14.9	8.8	6.10
TRP	3.3	1.8	1.24
TYR	5.2	5.1	3.58
VAL	10.2	10.4	7.22
Total	127.5	95.9	73.89

[0085] Using the formula to determine baseline-adjusted amino acid concentration(s) and to develop desired cell culture media formulations for large-scale polypeptide production, the inventors have identified several criteria that result in high titer and high cell density cultures. The criteria for producing a titer higher than 5 g/L, which are represented by the values shown in **Table 4**, include, but are not limited to, one or more of the following: greater than or equal to about 3 mM tyrosine; between about 7 mM and about 30 mM proline; between about 7 mM and about 30 mM valine; between about 7 mM and about 30 mM leucine;

between about 7 mM and about 30 mM threonine; between about 7 mM and about 30 mM lysine; a combined concentration of leucine, lysine, proline, threonine and valine that is between about 35 mM and about 150 mM; a combined concentration of leucine, lysine, threonine and valine that is between about 60% to about 80% of the total essential amino acids in the desired cell culture medium; a combined concentration of the essential amino acids in the desired cell culture medium that is between about 30% to about 50% of the total amino acids in the desired cell culture medium; and/or a combined concentration of total amino acids between about 75 mM and about 510 mM.

Table 4: Representative Examples of the Amino Acid Content and Relationships For Rationally Designed Media for Various Target Titers and Desired Peak Cell Densities (as noted above, the basic unit of polypeptide titer is 1 g/L, and the basic unit of cell mass is 10^6 cells/ml).

Amino Acid	N=5 M=10 Y=0 F=1 (mM)	N=10 M=10 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=10 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=20 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=30 Y=1.5 F=1.3 (mM)
ALA	5.08	13.21	15.86	23.77	37.62
ARG	2.46	6.39	7.51	11.65	18.88
ASN	2.80	7.28	8.98	12.85	19.62
ASP	4.34	11.29	13.15	20.71	33.94
CYS	1.89	4.91	6.14	8.60	12.91
GLU	3.55	9.24	11.84	15.89	22.96
GLN	4.87	12.66	15.18	22.80	36.15
GLY	4.90	12.73	15.79	22.39	33.93
HIS	1.50	3.91	4.94	6.78	10.01
ILE	2.27	5.91	6.84	10.88	17.96
LEU	4.98	12.94	16.12	22.71	34.25
LYS	4.97	12.92	16.30	22.46	33.23
MET	1.06	2.76	3.39	4.88	7.50
PHE	2.35	6.11	7.63	10.71	16.09
PRO	4.53	11.77	15.63	19.67	26.75
SER	8.27	21.51	27.83	36.70	52.21
THR	5.43	14.11	18.53	23.81	33.04
TRP	1.19	3.10	4.16	5.13	6.82
TYR	2.92	7.60	9.87	12.94	18.33
VAL	6.01	15.63	20.42	26.48	37.10
Total Concentration	75.37	195.97	246.11	341.81	509.28
Total Essential	32.22	83.78	105.84	145.49	214.87
Total Bold	21.39	55.61	71.37	95.46	137.61
Bold/Essential	66%	66%	67%	66%	64%
Bold/Total	28%	28%	29%	28%	27%
Essential/Total	43%	43%	43%	43%	42%

[0086] In Table 4, the bold amino acids are valine, threonine, leucine and lysine, the italicized amino acids are the essential amino acids (e.g., arginine, histidine, leucine, isoleucine, lysine, methionine, tryptophan, threonine, and valine; and for CHO cell cultures, proline is additionally an essential amino acid; one of skill in the art is aware of variations in the definition of essential amino acids as it applies to different cells, etc.). Table 4 provides representative desired cell culture

media for CHO cells at a variety of target cell densities (M), target titers (N), cell maintenance requirements (Y), and baseline adjustments (F).

[0087] One of skill in the art will recognize that the rationally designed media of the invention may be used to either produce a polypeptide of interest, or may be used in cell culturing that is not designed for polypeptide production.

Accordingly, a rationally designed media may be used in the disclosed methods of cell culturing, e.g., for the efficient growth, replication and/or maintenance of cell cultures, e.g., large-scale cell cultures, that do not contain host cells

engineered to produce an exogenous polypeptide of interest, or which are not cultured to produce an endogenous polypeptide of interest. In such an instance, the desired cell culture medium need not account for the amino acid(s) required for incorporation into the polypeptide of interest, and instead contains an amino acid concentration(s) based on the concentration of the amino acid(s) required for: 1) desired cell mass, and 2) cell maintenance. Such a desired cell culture medium used in the disclosed methods of cell culturing contains a baseline-adjusted amino acid concentration, A' , according to the formula

$A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, M is a multiplier for a desired peak cell mass (e.g., desired peak cell density, etc.) of the cell culture, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor. A desired cell culture medium produced according to this formula is then provided to a cell culture under conditions that allow growth and replication of the cells in the cell culture. In one embodiment of the invention, the method of cell culturing uses a large-scale cell culture. In another embodiment of the invention, the method of cell culturing uses animal cells.

Proline Addition to Cell Culture Media

[0088] Using the rational media design methods disclosed herein, it has been determined that maintaining high proline levels throughout the culture period of cell culture, e.g., large-scale cell culture, results in increased polypeptide titer and increased cell density. This proline "threshold" ranges from about 1 mM to about 2 mM, and a level of proline in the cell culture maintained above this threshold appears to be a driving force for producing high cell density, high titer large-scale cell cultures. Interestingly, the proline-driven increased polypeptide titer and cell

viability concomitantly increases the culture's requirement for additional amino acids (in order to satisfy the increased consumption rate), which at least partially explains why the rationally designed media formulations herein contain high amino acid concentrations.

Providing a Cell Culture

[0089] Various methods of preparing mammalian cells for production of polypeptides by batch and fed-batch culture are well known in the art. As described above, a nucleic acid sufficient to achieve expression (typically a vector containing the nucleic acid encoding the polypeptide of interest and any operably linked genetic control elements) may be introduced into the host cell line by any number of well-known techniques. Typically, cells are screened to determine which of the host cells have actually taken up the vector and express the polypeptide or protein of interest. Traditional methods of detecting a particular polypeptide or protein of interest expressed by mammalian cells include, but are not limited to, immunohistochemistry, immunoprecipitation, flow cytometry, immunofluorescence microscopy, SDS-PAGE, Western blots, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), high performance liquid chromatography (HPLC) techniques, biological activity assays and affinity chromatography. One of ordinary skill in the art will be aware of other appropriate techniques for detecting expressed polypeptides or proteins. If multiple host cells express the polypeptide or protein of interest, some or all of the listed techniques can be used to determine which of the cells expresses that polypeptide or protein at the highest levels.

[0090] Once a cell that expresses the polypeptide or protein of interest has been identified, the cell is propagated in culture by any of the variety of methods well known to one of ordinary skill in the art. The cell expressing the polypeptide or protein of interest is typically propagated by growing it at a temperature and in a medium that is conducive to the survival, growth and viability of the cell. The initial culture can be of any volume, but is often of lower volume than the culture volume of the production bioreactor used in the final production of the polypeptide or protein of interest, and frequently cells are passaged several times in bioreactors of increasing volume prior to seeding the production bioreactor.

The cell culture can be agitated or shaken to increase oxygenation of the medium and dispersion of nutrients to the cells. Alternatively or additionally, special sparging devices that are well known in the art can be used to increase and control oxygenation of the culture. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of a cell culture, including but not limited to pH (e.g., 6.6 to 7.6), temperature (e.g., 25°C to 42°C), levels of oxygen and carbon dioxide (e.g., O₂: 10% to 80% and CO₂: 7% to 15%, throughout culture), and osmolality (e.g., a starting osmolality of 260 to 340 mOsm/kg), etc.

[0091] As used herein, the term "inoculum" is used to refer to a volume of cells containing the nucleic acid that expresses the polypeptide of interest, which is used to seed the production vessel in which the large-scale animal culture will occur, e.g., the production bioreactor. In one embodiment of the invention, the inoculum volume is about 60 to 80% of the final volume.

[0092] The starting cell density in the production bioreactor can be chosen by one of ordinary skill in the art. In accordance with the present invention, the starting cell density in the production bioreactor can be as low as a single cell per culture volume. In preferred embodiments of the present invention, starting cell densities in the production bioreactor can range from about 0.1×10^6 viable cells per mL to about 10×10^6 viable cells per mL and higher.

[0093] Initial and intermediate cell cultures may be grown to any desired density before seeding the next intermediate or final production bioreactor. In one embodiment of the invention, the inoculum cell density is about $0.5-1 \times 10^6$ cells/mL. It is preferred that most of the cells remain alive prior to seeding, although total or near total viability is not required. In one embodiment of the present invention, the cells may be removed from the supernatant, for example, by low-speed centrifugation. It may also be desirable to wash the removed cells with a medium before seeding the next bioreactor to remove any unwanted metabolic waste products or medium components. The medium may be the medium in which the cells were previously grown or it may be a different medium or a washing solution selected by the practitioner of the present invention.

[0094] The cells may then be diluted to an appropriate density for seeding the production bioreactor. The cells can be diluted into another medium or solution, e.g., the starting cell culture medium or the desired cell culture medium, depending on the needs and desires of the practitioner of the present invention or to accommodate particular requirements of the cells themselves (e.g., if the cells are to be stored for a short period of time prior to seeding the production bioreactor).

Initial Growth Phase

[0095] Once the production vessel is seeded as described above, the animal cell culture may be maintained in the initial growth phase using the desired cell culture medium obtained by the inventive formula disclosed herein, and under conditions conducive to the survival, growth and viability of the cell culture. The precise conditions will vary depending on the cell type, the organism from which the cell was derived, and the nature and character of the expressed polypeptide or protein.

[0096] A production bioreactor can be any volume that is appropriate for large-scale production of polypeptides or proteins. In a preferred embodiment, the volume of the production bioreactor is at least 500 liters. In other preferred embodiments, the volume of the production bioreactor is 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000 liters or more, or any intermediate volume. One of ordinary skill in the art will be aware of, and will be able to choose, a suitable bioreactor for use in practicing the present invention. The production bioreactor may be constructed of any material that is conducive to cell growth and viability that does not interfere with expression or stability of the produced polypeptide or protein.

[0097] The temperature of the cell culture in the initial growth phase will be selected based primarily on the range of temperatures at which the cell culture remains viable. For example, during the initial growth phase, CHO cells grow well at 37°C. In general, most mammalian cells grow well within a range of about 35°C to 39°C. In one embodiment of the invention, the temperature for growth phase (day 0 to day 3) is 37°C, and the temperature for production phase (after day 3) is 31°C. Those of ordinary skill in the art will be able to select

appropriate temperature or temperatures in which to grow cells, depending on the needs of the cells and the production requirements of the practitioner.

[0098] In one embodiment of the present invention, the temperature of the initial growth phase is maintained at a single, constant temperature. In another embodiment, the temperature of the initial growth phase is maintained within a range of temperatures. For example, the temperature may be steadily increased or decreased during the initial growth phase. Alternatively, the temperature may be increased or decreased by discrete amounts at various times during the initial growth phase. One of ordinary skill in the art will be able to determine whether a single or multiple temperatures should be used, and whether the temperature should be adjusted steadily or by discrete amounts.

[0099] The cells may be grown during the initial growth phase for a greater or lesser amount of time, depending on the needs of the practitioner and the requirement of the cells themselves. In one embodiment, the cells are grown for a period of time sufficient to achieve a viable cell density that is a given percentage of the maximal viable cell density that the cells would eventually reach if allowed to grow undisturbed. For example, the cells may be grown for a period of time sufficient to achieve a desired viable cell density of 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or 99 percent or more of maximal viable cell density.

[0100] In another embodiment the cells are allowed to grow for a defined period of time. For example, depending on the starting concentration of the cell culture, the temperature at which the cells are grown, and the intrinsic growth rate of the cells, the cells may be grown for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more days. In some cases, the cells may be allowed to grow for a month or more. The cells would be grown for 0 days in the production bioreactor if their growth in a seed bioreactor, at the initial growth phase temperature, was sufficient that the viable cell density in the production bioreactor at the time of its inoculation is already at the desired percentage of the maximal viable cell density. The practitioner of the present invention will be able to choose the duration of the initial growth phase depending on polypeptide or protein production requirements and the needs of the cells themselves.

[0101] The cell culture may be agitated or shaken during the initial culture phase in order to increase oxygenation and dispersion of nutrients to the cells. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of the bioreactor during the initial growth phase, including but not limited to pH, temperature, oxygenation, etc. For example, pH can be controlled by supplying an appropriate amount of acid or base, and oxygenation can be controlled with sparging devices that are well known in the art.

Shifting Culture Conditions

[0102] At the end of the initial growth phase, a culture condition(s) may be shifted so that a second set of culture conditions is applied and a metabolic shift occurs in the culture. The accumulation of inhibitory metabolites, most notably lactate and ammonia, inhibits growth. A metabolic shift, accomplished by, e.g., a change in the temperature, pH, osmolality or chemical inductant level of the cell culture, may be characterized by, e.g., a reduction in the ratio of a specific lactate production rate to a specific glucose consumption rate. In one nonlimiting embodiment, the culture conditions are shifted by changing the temperature of the culture. In another embodiment of the invention, the temperature shift occurs on day 1-7. In another embodiment of the invention, the temperature is shifted to 29°C - 32°C. In another embodiment of the invention, the temperature shift occurs at day 3, and the temperature is shifted to 31°C. Teachings regarding temperature shift and metabolic shift may be found in the art (see, e.g., U.S. Published Patent Application No. US 2006/0121568).

Subsequent Production Phase

[0103] Once the conditions of the cell culture have been shifted as discussed above, the cell culture may be maintained for a subsequent production phase under a second set of culture conditions conducive to the survival and viability of the cell culture and appropriate for expression of the desired polypeptide or protein at adequate, e.g., commercially adequate, levels.

[0104] As discussed above, the culture may be shifted by shifting one or more of a number of culture conditions including, but not limited to, temperature, pH, osmolality, and sodium butyrate levels. In one embodiment, the temperature of

the culture is shifted. According to this embodiment, during the subsequent production phase, the culture is maintained at a temperature or temperature range that is lower than the temperature or temperature range of the initial growth phase. For example, during the subsequent production phase, CHO cells express recombinant polypeptides and proteins well within a range of 25°C to 35°C. In one embodiment of the invention, the production phase begins after day 3. In another embodiment of the invention, the production phase is carried out at 31°C. As discussed in U.S. Published Patent Application No. US 2006/0121568, multiple discrete temperature shifts may be employed to increase cell density or viability or to increase expression of the recombinant polypeptide or protein.

[0105] In accordance with the formula of the present invention, a desired cell mass (e.g., cell density) and production titer (e.g., target titer) are selected in order to establish the baseline-adjusted amino acid concentration, A, and the starting amino acid concentration, B. Thus, generally the cells are maintained in the subsequent production phase until the desired cell density or production titer, or a value(s) near the desired cell density or production titer is reached. In one embodiment, the cells are maintained in the subsequent production phase until the titer of the recombinant polypeptide or protein reaches a maximum. In other embodiments, the culture may be harvested prior to this point, depending on the production requirement of the practitioner or the needs or viability of the cells themselves. For example, the cells may be maintained for a period of time sufficient to achieve a viable cell density of 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or 99 percent or more of maximal viable cell density. In some cases, it may be desirable to allow the viable cell density to reach a maximum, and then allow the viable cell density to decline to some level before harvesting the culture. In an extreme example, it may be desirable to allow the viable cell density to approach or reach zero before harvesting the culture.

[0106] In another embodiment of the present invention, the cells are allowed to grow for a defined period of time during the subsequent production phase. For example, depending on the concentration of the cell culture at the start of the subsequent growth phase, the temperature at which the cells are grown, and the

intrinsic growth rate of the cells, the cells may be grown for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or more days. In some cases, the cells may be allowed to grow for a month or more. The practitioner of the present invention will be able to choose the duration of the subsequent production phase depending on polypeptide or protein production requirements and the needs of the cells themselves. The duration of culture will help determine the amino acid concentration required for cell maintenance, which may range in the present invention from, e.g., 0% to 150% of the amino acid concentration required for cell mass.

[0107] In certain cases, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture, i.e., feed the cell culture, during the subsequent production phase with nutrients or other medium components that have been depleted or metabolized by the cells. For example, it might be advantageous to supplement the cell culture with nutrients or other medium components observed to have been depleted during monitoring of the cell culture (see "Monitoring Cell Culture Conditions" section, below). Alternatively or additionally, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture prior to the subsequent production phase. As nonlimiting examples, it may be beneficial or necessary to supplement the cell culture with hormones and/or other growth factors, particular ions (such as sodium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers, vitamins, nucleosides or nucleotides, trace elements (inorganic compounds usually present at very low final concentrations), lipids, amino acids, or glucose (or another energy source).

[0108] These supplementary components may all be added, i.e., fed, to the cell culture at one time, or they may be provided to the cell culture in a series of additions. In one embodiment of the present invention, the supplementary components are provided to the cell culture at multiple times in proportional amounts. In another embodiment, it may be desirable to provide only certain of the supplementary components initially, and provide the remaining components at a later time. In yet another embodiment of the present invention, the cell culture is fed continually with these supplementary components.

[0109] In accordance with the present invention, the total volume added to the cell culture should optimally be kept to a minimal amount. For example, the total volume of the feeding medium, or solution containing the supplementary components, added to the cell culture may be 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50% of the volume of the cell culture prior to providing the supplementary components. Thus, the feeding medium should be concentrated in order to avoid bioreactor overflow or medium component dilution. The feeding medium is preferably provided to the main culture with the same pH, temperature, etc., but with high concentrations of nutrients relative to the starting medium. In one embodiment of the invention, the feeding medium is the feeding medium designated "Feed Medium" in column 4 of Table 2.

[0110] In one embodiment of the invention, a cell culture with a starting amino acid concentration, B, is supplemented with an additional amino acid(s) in order to achieve a baseline-adjusted amino acid concentration, A. In another embodiment of the invention, the cell culture is provided with a continuous feed from about days 3-21, or periodic feeds every 2-3 days. In another embodiment of the invention, the feeding occurs from about day 3 to about day 20 (for a 21-day culture) as bolus feeds. In another embodiment of the invention, the feeding occurs as periodic feeds about every 2-3 days. In yet another embodiment of the invention, the feeding volume is about 1% to about 40% of the total cell culture volume.

[0111] The cell culture may be agitated or shaken during the subsequent production phase in order to increase oxygenation and dispersion of nutrients to the cells. In accordance with the present invention, one of ordinary skill in the art will understand that it can be beneficial to control or regulate certain internal conditions of the bioreactor during the subsequent growth phase, including but not limited to pH, temperature, oxygenation, etc. For example, pH can be controlled by supplying an appropriate amount of acid or base, and oxygenation can be controlled with sparging devices that are well known in the art.

Monitoring Cell Culture Conditions

[0112] In certain embodiments of the present invention, the practitioner may find it beneficial or necessary to periodically monitor particular conditions of the

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

[0113] As nonlimiting examples, it may be beneficial or necessary to monitor temperature, pH, cell density, cell viability, integrated viable cell density, lactate levels, ammonium levels, osmolarity, or titer of the expressed polypeptide.

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

Harvesting Polypeptides Produced by Cell Culture

[0114] The polypeptide of interest that is produced by the cell culture may then be purified from the culture medium or from cell extracts for use in various applications. Soluble forms of the polypeptide can be purified from conditioned media. Membrane-bound forms of the polypeptide can be purified by preparing a total membrane fraction from the expressing cell and extracting the membranes

with a nonionic detergent such as TRITON[®] X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Cytosolic or nuclear proteins may be prepared by lysing the host cells (via mechanical force, Parr-bomb, sonication, detergent, etc.), removing the cell membrane fraction by centrifugation, and retaining the supernatant.

[0115] The polypeptide can be purified using other methods known to those skilled in the art. For example, a polypeptide produced by the disclosed methods can be concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an AMICON[®] or PELLICON[®] ultrafiltration unit (Millipore, Billerica, MA). Following the concentration step, the concentrate can be applied to a purification matrix such as a gel filtration medium. Alternatively, an anion exchange resin (e.g., a MonoQ column, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) may be employed; such resin contains a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) or polyethylenimine (PEI) groups. The matrices used for purification can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step may be used for purification of proteins. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups (e.g., S-SEPHAROSE[®] columns, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

[0116] The purification of the polypeptide from culture supernatant may also include one or more column steps over affinity resins, such as concanavalin A-agarose, AF-HEPARIN650, heparin-TOYOPEARL[®] or Cibacron blue 3GA SEPHAROSE[®] (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); hydrophobic interaction chromatography columns using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or immunoaffinity columns using antibodies to the labeled protein.

Finally, one or more high performance liquid chromatography (HPLC) steps employing hydrophobic HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups (e.g., Ni-NTA columns), can be employed to further purify the protein. Alternatively, the polypeptides may be recombinantly expressed in a form that facilitates purification. For example, the polypeptides may be expressed as a fusion with proteins such as maltose-binding protein (MBP), glutathione-S-transferase (GST), or thioredoxin (TRX). Kits for expression and purification of fusion proteins are commercially available from New England

BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively. The proteins can also be tagged with a small epitope (e.g., His, myc or Flag tags) and subsequently identified or purified using a specific antibody to the chosen epitope. Antibodies to common epitopes are available from numerous commercial sources.

[0117] As an alternative to traditional chromatography purification modes (e.g., flow-through and bind-elute chromatography purification modes), the polypeptides produced by the methods of the present invention may be purified by operating a chromatography purification column in a weak partitioning mode, a technique in which at least one product contained in the preparation, and at least one contaminant or impurity, both bind to a chromatographic resin or medium. In the weak partitioning mode, the at least one impurity binds more tightly to the medium than the polypeptide product; and as loading (of the load fluid) continues, unbound polypeptide product selectively passes through the medium and is recovered from the column effluent. Such purification results in a high degree of impurity reduction, as well as high product recovery. Such purification can be achieved on media and resins known in the art, including but not limited to, charged ion exchange medium, hydrophobic interaction chromatography resin, immobilized metal affinity chromatography resin, and hydroxyapatite resin. In at least one embodiment, impurity / contaminant removal under weak partitioning conditions occurs as the load fluid passes through a medium / resin that binds at least 2.8 mg of product per ml of medium / resin. In at least one other embodiment, impurity / contaminant removal under weak partitioning conditions occurs as the load fluid passes through a medium / resin at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1. The purified product is recovered from the effluent of the column containing the medium / resin.

[0118] Table 5 summarizes the differences in the characteristics between flow-through (FT), bind-elute (B-E), and the weak partitioning (WP) modes.

Table 5: Characteristics of FT / WP / B-E Modes			
	FT	WP	B-E
K_p	< 0.1	0.1-20	>20
Load challenge limitation	Impurities 10–50 mg Prod/mL (typical) but actually dependent on load purity	Impurities 50–500 mg Prod/mL (typical) but actually dependent on load purity	Product + impurities < 100 mg Prod/mL
Load Vol.	Moderate, for dilute impurities 10–20 CVs	Very high, for dilute impurities up to 50 CVs	Lower, as the product binds in addition to impurities 5–20 CVs
[Product] in load eluate	Equal to load concentration through much of load	Initial lag, then equal to load concentration through much of load	<5% of load concentration
Residual [Impurity]	Low	Very low	Dependent on elution conditions, pool volume and capacity
Product bound (Q)	< 1 mg/mL	< 10 - 20 mg/mL	> 10 – 20 mg/mL
Operating region	Relatively broad range of conditions	Modest window of operation between FT and B-E modes	Stringent binding conditions for load, broad range of elution conditions
Mobile phase(s)	Isocratic	Isocratic	Change in buffer composition after load which causes elution

[0119] The partition coefficient (K_p) is the ratio of the concentration of the adsorbed product (Q) to the concentration of the product in solution (C); thus the K_p for the weak partitioning mode is intermediate between the K_p for the flow-through and bind-elute modes, e.g., between about 0.1 and 20. In order to determine the proper conditions, e.g., salt, buffer, pH, etc., for a weak partitioning mode of purification, a high-throughput screen or a batch purification screening study can be performed. Thus, one skilled in the art can determine product partition coefficients K_p as a function of operating conditions (see Example 7.1).

[0120] Purification methods using a weak partitioning mode are described in detail in U.S. Patent Application Nos. 11/372,054 and 11/510,634, both of which are incorporated by reference herein in their entireties.

[0121] Some or all of the foregoing purification steps in various combinations or with other known methods, can be employed to purify a polypeptide of interest produced by the large-scale animal cell culture methods and media described herein.

Pharmaceutical Compositions Containing Polypeptides Produced by Cell Culture

[0122] The foregoing cell culture media, e.g., large-scale cell culture media, and methods of culturing cells provides polypeptides of interest, e.g., antibodies, soluble receptors, fusion proteins, etc. The polypeptides produced by the disclosed cell culturing methods, and with the novel media and related methods disclosed herein, including antibodies and fragments thereof, may be used *in vitro*, *ex vivo*, or incorporated into pharmaceutical compositions and administered to individuals (e.g., human subjects) in need thereof. Several pharmacogenomic approaches to consider in determining whether to administer a polypeptide of the invention are well known to one of skill in the art and include genome-wide association, candidate gene approach, and gene expression profiling. A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration (e.g., oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier). Other nonlimiting examples of routes of administration include parenteral (e.g., intravenous), intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. The pharmaceutical compositions compatible with each intended route are well known in the art.

[0123] A polypeptide of the invention may be used as a pharmaceutical composition when combined with a pharmaceutically acceptable carrier. Such a composition may contain, in addition to a polypeptide of the invention, carriers, various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a nontoxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier will depend on the route of administration.

[0124] The pharmaceutical composition of the invention may also contain additional therapeutic factors or agents for treatment of the particular targeted disorder. For example, a pharmaceutical composition for treatment of type 2 diabetes may also include an oral antidiabetic agent. The pharmaceutical composition may contain thrombolytic or antithrombotic factors such as plasminogen activator and Factor VIII. The pharmaceutical composition may

further contain anti-inflammatory agents. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with a polypeptide of the invention, or to minimize side effects caused by the polypeptides of the invention.

[0125] The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a liposome in which a polypeptide of the invention is combined, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids that exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, etc.

[0126] As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, e.g., amelioration of symptoms of, healing of, or increase in rate of healing of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination, the term refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

[0127] In practicing the method of treatment or use of the present invention, a therapeutically effective amount of a polypeptide of the invention is administered to a subject, e.g., a mammal (e.g., a human). A polypeptide of the invention may be administered in accordance with the method of the invention either alone or in combination with other therapies. When coadministered with one or more agents, a polypeptide of the invention may be administered either simultaneously with the second agent, or sequentially. If administered sequentially, the attending physician will decide on the appropriate sequence of administering the polypeptides of the invention in combination with other agents.

[0128] When a therapeutically effective amount of a polypeptide of the invention is administered orally, the binding agent will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a

gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% binding agent, and preferably from about 25 to 90% binding agent. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin, such as peanut oil (exercising caution in relation to peanut allergies), mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol, or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5% to about 90% by weight of the binding agent, and preferably from about 1% to about 50% by weight of the binding agent.

[0129] When a therapeutically effective amount of a polypeptide of the invention is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the polypeptide of the invention will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill of those in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to the polypeptide of the invention, an isotonic vehicle such as sodium chloride injection, Ringer's injection, dextrose injection, dextrose and sodium chloride injection, lactated Ringer's injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or any other additive(s) known to those of skill in the art.

[0130] The amount of a polypeptide of the invention in the pharmaceutical composition of the present invention will depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments that the patient has undergone. Ultimately, the attending physician will decide the amount of a pharmaceutical composition or polypeptide of the invention with which to treat each individual patient. Initially, the attending physician will administer low doses of a pharmaceutical composition or polypeptide of the invention and observe the patient's response. Larger doses of a pharmaceutical composition or

polypeptide of the invention may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not generally increased further. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to treat a subject in need thereof should contain about 0.1 μ g to about 100 mg of a polypeptide of the invention per kg body weight.

[0131] The duration of intravenous (i.v.) therapy using a pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual patient. It is contemplated that the duration of each application of a pharmaceutical composition or a polypeptide of the present invention may be within the range of, e.g., 1-12, 6-18, or 12-24 hrs of continuous or intermittent i.v. administration. Also contemplated is subcutaneous (s.c.) therapy using a pharmaceutical composition of the present invention. These therapies can be administered daily, weekly, or, more preferably, biweekly, or monthly. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of i.v. or s.c. therapy, or therapy with a small molecule, and the timing of administration of the therapy, using the pharmaceutical composition of the present invention.

[0132] All of the references, patents, patent applications, and publications cited in this application are hereby incorporated by reference herein in their entireties.

EXAMPLES

[0133] The Examples which follow are set forth to aid in the understanding of the invention but are not intended to, and should not be construed to, limit the scope of the invention in any way. The Examples do not include detailed descriptions of conventional methods, such as recombinant DNA techniques. Such methods are well known to those of ordinary skill in the art.

Example 1

Quantifying the Amino Acid Composition of CHO Cells

[0134] To quantify the amino acid composition of antibody-expressing CHO cells and recombinant protein-expressing CHO cells, i.e., the molar percentage of each amino acid relative to the amino acid total of cell mass (biomass), the following procedure was performed. Briefly, three CHO cell lines

overexpressing antibodies or recombinant protein, more specifically anti-IL-22 antibody (recombinant human anti-IL-22 antibody), Myo-029 antibody (anti-GDF8 IgG1 monoclonal antibody), and recombinant human BMP-2, were grown in a shake flask for one (BMP-2) or three (Myo-029 and anti-IL-22) days. On the final day, the cultures were harvested and the cells spun to a concentration of 10^6 cells/mL. A 10^6 cell-containing pellet was washed twice with 1 X PBS and the pellet resuspended in 500 μ L of 5 N HCl. The cell-containing suspension was heated at 100°C for 24 hours, at which point the suspension was vacuum centrifuged. The resulting pellet was resuspended in 500 μ L PBS, and amino acid analysis was performed using gas or liquid chromatography.

[0135] Acid hydrolysis determined that methionine and tryptophan both degrade during acid hydrolysis; thus, the concentrations of these amino acids in Examples 2 and 3 were based on literature values for CHO cells. In addition, it was determined that glutamine and asparagine were converted to their acidic forms, glutamic acid and aspartic acid, respectively, during hydrolysis; thus, the concentrations for these four amino acids in Examples 2 and 3 were adjusted based on the glutamine / glutamic acid and asparagine / aspartic acid ratios reported in literature. Otherwise, it was determined that these CHO cell lines possess similar amino acid compositions, and closely matched reported values for other mammalian cells (data not shown) (see Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318).

Example 2

Desired Peak Cell Density of 15×10^6 cells/mL, and Target Anti-IL-22 Antibody Titer of 9 g/L in CHO Cells (Cell Line 1) with 32% Volume Feed Using Rationally Designed Medium

Example 2.1: Rationally Designed Medium

[0136] Using the formula disclosed herein, the baseline-adjusted amino acid concentration, A, of amino acids required for 15×10^6 cells/mL producing 9 g/L anti-IL-22 antibody in CHO Cell Line 1 were determined (Table 6, column 2) (cell maintenance was set at 50%, i.e., $Y=0.5$). The baseline-adjusted amino acid concentration, A (Table 6, column 2), of a variety of amino acids were adjusted to obtain the modified baseline-adjusted total amino acid concentrations shown in

column 3 of **Table 6**. The following adjustments were made: levels of Asn, Asp, and Gln were set according to U.S. Published Patent Application No.

US2006/0121568A1; 2) because Ala, Glu, Gly were produced by the cell cultures, their levels were adjusted to lower values; 3) the level of Cys was adjusted due to the fact that cystine is also used in the feeding medium, and the medium value of cystine is set to that in U.S. Published Patent Application No. US2006/0121568A1; 4) levels of Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe are 20% to 100% higher than the baseline-adjusted amino acid concentration, A, due to the fact that the feed powder, which contains a set amino acid composition, was used to make the desired cell culture medium, such that an exact match was not possible. The starting medium amino acid concentration, B (**Table 6**, column 4), was calculated from the modified baseline-adjusted total amino acid concentrations shown in column 3 of **Table 6**.

Table 6: Desired Cell Culture Medium Formulation

Amino Acid	Baseline-Adjusted Amino Acid Concentration (mM) (A)	Modified Baseline-Adjusted Amino Acid Concentration (mM)	Starting Amino Acid Concentration (mM) (B)
ALA	13.67	2.18	0.20
ARG	6.68	12.56	1.94
ASN	7.42	27.82	14.56
ASP	11.86	6.28	1.70
CYS	4.97	0.27	0.40
GLU	9.23	2.18	0.20
GLN	13.11	2.72	4.00
GLY	12.94	4.52	3.63
HIS	3.93	5.05	2.15
ILE	6.23	10.95	2.54
LEU	13.13	17.96	6.87
LYS	13.01	15.62	7.91
MET	2.82	5.71	2.38
PHE	6.19	7.67	3.76
PRO	11.50	11.15	7.36
SER	21.35	22.34	10.20
THR	13.89	14.18	8.80
TRP	3.00	2.89	1.84
TYR	7.53	7.55	5.10
VAL	15.44	15.24	10.36
Total	197.91	194.85	95.91

Example 2.2: Cell Density and Antibody Titer in Response to Rationally Designed Medium

[0137] Cell line 1 cells (anti-IL-22-expressing CHO cells) were obtained from shake flasks containing day 3 cultures, and were inoculated at 0.7×10^6 cells/ml on day 0 into the starting cell culture medium in a 1L bioreactor (Applikon 2L, (Applikon Inc, Foster City, CA)). On day 3 (about 80 hours), temperature was shifted from 37°C to 31°C and Feed Medium (see column 4 of **Table 2**) was added at 3.75%, 4%, 4%, 9%, 2%, 1%, 1%, 1%, 3%, 2% and 1% by volume on days 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20, respectively, to obtain the desired cell culture medium, which contains the amino acid concentration shown in **Table 6**, column 3. Cell cultures were maintained at pH 7.0, in a dissolved oxygen level of 30%, and with agitation at 200 rpm. Samples were taken daily to test for cell density (CEDEX® cell counting instrument (Innovatis, Malvern, PA)), viability (CEDEX®) and certain metabolite levels (Nova BioProfile Analyzer, Nova Biomedical Cooperation, Waltham, MA). Spun-down media were saved at -80°C for antibody titer analysis using Protein A HPLC.

[0138] The results are shown in **Figures 1 and 2**. As can be seen from **Figure 1**, the highest cell density (about 11×10^6 cells/mL) was achieved on day 11 of culture, with cell density decreasing thereafter. The highest antibody titer (about 7 g/L) was obtained on day 21 of culture. Thus, the rationally designed medium may be used to produce high cell density and high antibody titer.

Example 3

Desired Peak Density of 15×10^6 cells/ml, and Target Anti-IL-22 Antibody Titer of 10 g/L in CHO cells (Cell Line 2) with 33% Volume Feed Using Rationally Designed Medium

Example 3.1: Rationally Designed Medium

[0139] Using the formula disclosed herein, the baseline-adjusted amino acid concentration, A, of amino acids required for 15×10^6 cells/ml and 10 g/L anti-IL-22 antibody (described above) were determined (cell maintenance was set at 50%, i.e., $Y=0.5$). The baseline-adjusted amino acid concentration, A (**Table 7**, column 2) of a variety of amino acids were adjusted as described in Example 2 to obtain the modified baseline-adjusted total amino acid concentrations shown in column 3 of **Table 7**. In addition, for this medium formulation both the starting

cell culture medium and the feed medium were prepared from existing powders with fixed compositions, and thus an exact match was not possible. The starting medium amino acid concentration, B (Table 7, column 4), was calculated from the modified baseline-adjusted total amino acid concentrations shown in column 3 of Table 7.

Table 7: Desired Cell Culture Medium Formulation

Amino Acid	Baseline-Adjusted Amino Acid Concentration (mM) (A)	Modified Baseline-Adjusted Amino Acid Concentration (mM)	Starting Amino Acid Concentration (mM) (B)
ALA	14.2	2.4	0.4
ARG	6.9	15.2	5.3
ASN	7.8	32.6	21.1
ASP	12.2	6.8	2.3
CYS	5.2	0.3	0.4
GLU	9.7	2.4	0.4
GLN	13.6	2.7	4.0
GLY	13.6	4.5	3.6
HIS	4.1	5.5	2.7
ILE	6.4	13.2	5.4
LEU	13.8	20.0	9.4
LYS	13.7	16.5	8.9
MET	2.9	6.3	3.1
PHE	6.5	8.3	4.5
PRO	12.3	12.5	9.1
SER	22.6	23.8	11.8
THR	14.8	15.7	10.8
TRP	3.2	3.2	2.3
TYR	8.0	7.6	5.1
VAL	16.4	15.4	10.3
Total	207.93	214.8	121.1

Example 3.2: Cell Density and Antibody Titer in Response to Rationally Designed Medium

[0140] Cell line 2 cells (anti-IL-22-expressing CHO cells) were obtained from shake flasks containing day 3 cultures, and the cells were inoculated at 0.7×10^6 cells/ml on day 0 into the starting cell culture medium in a 1L bioreactor (Applikon 2L). On day 3 (about 80 hours), temperature was shifted from 37°C to 31°C and feed was added continuously (1.8% by volume per day) with an automatic feeding pump, to obtain the desired cell culture medium, which contains the amino acid concentration shown in Table 7, column 3. Cell cultures were maintained at pH 7.0, in a dissolved oxygen level of 30%, and with agitation at 200 rpm. Samples were taken daily to test for cell density (CEDEX® cell counting instrument), viability (CEDEX®) and certain metabolites levels

(Nova Enzymatic analyzer). Spun-down media were saved at -80°C for antibody titer analysis using Protein A HPLC.

[0141] The results are shown in **Figures 3 and 4**. As can be seen from **Figure 3**, the highest cell density (over 12×10^6 cells/mL) was achieved on day 10 of culture, with cell density decreasing thereafter. The highest antibody titer (over 10 g/L) was obtained on day 19 of culture. Thus, the rationally designed medium may be used to produce high cell density and high antibody titer.

Example 4

The Effect of Proline Addition on Cell Culture Performance

[0142] CHO cells producing the antibody Anti-IL-22 were cultured in pH-controlled shake flasks (500 mL flasks with 100 mL working volume), and maintained on a shaker at ~ 100 rpm in a temperature-controlled, 7% CO_2 incubator. Cells were seeded at 0.7×10^6 cells/mL. The culture duration was 18 days. The first 3 days cells were maintained at 37°C , after which the temperature was shifted to 31°C for the remainder of the culture. pH was controlled for the first 3 days with 1 M sodium bicarbonate. Cell culture medium consisted of a medium based on traditional cell culture requirements, termed "Traditional Medium," and rationally designed medium, i.e., medium formulated using the rational design disclosed herein, termed "Rational Design Medium," to achieve 10×10^6 cells/mL and 10 g/L antibody. A major difference of note between these two formulations is that several amino acids (PRO, THR, GLY, TYR, TRP, VAL, and PHE) are at higher concentrations in the "Rational Design Medium" compared to the "Traditional Medium." A third condition presented is the traditional medium with an additional 3.7 mM proline added to obtain the level of proline in the "Rational Design Medium", termed "Traditional Medium + Proline." These formulations are presented in **Table 8**, below. Wyeth in-house feed medium ("Feed Medium," see **Table 2**) was added to the culture at 23% total by volume, comprising daily feeds of 2% on days 3-4, 9-14, 17, 1% on days 5-6, and 3% on day 7.

Table 8: Media Formulations for Proline Studies

1	2	3	4
Amino Acid	Traditional Medium [mM]	Rational Design Medium [mM]	Traditional Medium +Proline [mM]
alanine	0.44	0.44	0.44
arginine•HCl	5.32	5.32	5.32
asparagine•H ₂ O	21.08	21.08	21.08
aspartic acid	2.25	2.25	2.25
glutamine	4.00	4.00	4.00
glutamate	0.24	0.24	0.24
glycine	1.78	3.59	1.78
histidine	2.68	2.68	2.68
isoleucine	5.44	5.44	5.44
leucine	9.43	9.43	9.43
lysine•HCl	8.90	8.90	8.90
methionine	3.08	3.08	3.08
phenylalanine	3.67	4.48	3.67
proline	5.41	9.13	9.13
serine	11.82	11.82	11.82
threonine	5.71	10.85	5.71
tryptophan	1.54	2.32	1.54
tyrosine•2Na	3.34	5.13	3.34
valine	7.36	10.30	7.36

[0143] The results from these experiments are shown in **Figures 5-7**. Addition of proline to the traditional medium, i.e. “Traditional Medium + Proline” (**Figure 5**), resulted in an antibody production equivalent to the “Rational Design Medium” through day 14. As shown in **Figure 6**, all three media maintained a high cell density, with the highest density displayed at day 12. As shown in **Figure 7**, all three media maintained high cell viability, with the “Rational Design Medium” cultures maintaining greater viability on days 15–18 in comparison to the cultures containing “Traditional Medium” and “Traditional Medium + Proline” media. As a variety of other media, which each contained one rationally designed concentration of either glycine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine or valine did not result in cell cultures producing a higher antibody titer than the “Traditional Medium” (data not shown), proline serves as the rate-limiting amino acid required to achieve high titer. This is exemplified in **Figures 8A-E**, which show that by day 14 many of the amino acids in the

“Traditional Medium + Proline” reached extremely low levels (note tyrosine was depleted), thereby preventing further incorporation of these amino acids into antibody. This result is also observed in the titer graph (**Figure 5**), as the slope for the “Traditional Medium + Proline” is reduced after day 14, while antibody production is maintained through day 18 for the “Rational Design Medium,” which contains higher levels of other amino acids.

[0144] Interestingly, the proline concentration in the “Traditional Medium” never dropped below 1 mM (**Figure 8A**); however, the effect of proline on overall amino acid incorporation into antibody was reduced after day 11. This finding suggests that a proline threshold exists, i.e., the concentration of proline must be maintained above 1 mM throughout the culture.

Example 5

Prophetic Example: Optimized Cell Culture Media for a Novel Cell Line

[0145] The methods of media design disclosed herein may be used for any cell culture, including cell cultures that use novel cells / cell lines. The optimized media for use with a novel cell line would contain at least one baseline-adjusted amino acid concentration, A, of an amino acid according to the formula $A = [(M * X) + (N * P) + (Y * M * X)] * F$.

[0146] A multiplier, M, when applying the above equation to a novel cell culture, may be selected, e.g., from 1 to 20×10^6 cells/mL. One of skill in the art would be able to calculate a useful M value by doubling the maximum cell density during the growth phase, which can be calculated based on the growth rate.

[0147] A multiplier, N, when applying the above equation to a novel cell culture, may be calculated, e.g., by multiplying the IVC by the cell qp. One of skill in the art would be able to calculate the IVC by estimating the growth profile, following the methods described in the section entitled “Rational Media Design and Formulations.” One of skill in the art would be able to calculate the qp by measuring the antibody or recombinant protein production on a per cell basis.

[0148] A cell maintenance factor, Y, when applying the above equation to a novel cell culture, may be estimated by using $Y=1$ (i.e., 100% of the amino

acid(s) required for desired cell mass) initially, and then refining the value of Y (higher or lower).

[0149] A baseline factor, F, when applying the above equation to a novel cell culture, may be estimated by using $F=1.3$ (i.e., 30% additional amino acid(s)) initially, and then refining the value of F (higher or lower).

Example 6

Effect of Maintenance and Baseline Factors on Cell Culture Performance

[0150] To demonstrate that the maintenance factor, Y, and the baseline factor, F, are important / essential for cell culture performance, anti-IL-22-expressing CHO cells were seeded at 0.7×10^6 cells/mL and cultured for 21 days in 2L bioreactors with a pH set point of 7.0 and a dissolved oxygen (DO) setpoint of 30%. The pH was controlled by 2N $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, and DO was controlled by air (containing 7% CO_2) sparge. The temperature of the culture was 37°C for the first 3 days and shifted to 31°C after day 3, and remained at 31°C until the end of the culture. Cells were cultured for 21 days in either (1) media containing amino acids required for both target protein titer and desired peak cell density (but not accounting for the maintenance factor or baseline factor), i.e., "Rational Design Medium without maintenance and baseline factors," or (2) "Rational Design Medium."

[0151] As exemplified in **Figures 9 and 10**, the medium that does not account for maintenance and baseline factors displayed a significant decrease in viability, nearly approaching 0% at day 21 of the cell culture, and a significant decrease in cell density. Moreover, **Figure 11** demonstrates that at day 21 of the cell culture, this same medium was only able to support an antibody titer of 5 g/L.

[0152] In contrast, Rational Design Medium (including maintenance and baseline factors) displayed higher viability, cell density and antibody titers (**Figures 9-11**). At day 21 of the cell culture, the Rational Design Medium was able to support an antibody titer of 10 g/L.

[0153] These findings suggest that accounting for maintenance and baseline factors in determination of the amino acid concentration in the desired cell culture medium improves cell performance as measured by cell viability, cell density, and polypeptide titer.

Example 7

Polypeptide Purification Using Anion Exchange Chromatography in a Weak Partitioning Mode

Example 7.1. High-throughput screen to establish weak partitioning and flow-through conditions

[0154] An initial screening study was performed first, which determined the partition coefficient and/or the concentration of product bound to the resin under various solution conditions, thus defining the operating regions of weak partitioning (WP) and flow-through (FT) modes for Mab-AAB, the polypeptide of interest, and TMAE-HiCap (M) Medium. This screen varied the concentration of sodium chloride and pH to determine their effects on the extent of binding of Mab-AAB and process-related impurities (Protein A and HCP) to the TMAE medium.

[0155] The levels of Protein A residuals in the test samples were measured using a Protein A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The amount of high molecular weight aggregate was measured using an analytical size exclusion chromatography (SEC) assay. The levels of host cell proteins (HCPs) were measured using a HCP ELISA. All screening and column studies were conducted at room temperature.

[0156] Fifty μ L of TMAE HiCap medium was added to each well of a 96-well filter plate. Each well was equilibrated in solutions made up 50 mM glycine and a variable amount of Tris buffer (depending upon the amount needed for neutralization to the pH specified in **Table 9**) and sodium chloride (specified in **Table 10**). The pH ranged from 7.6 to 9.0, and the sodium chloride ranged from 0 mM to 80 mM.

[0157] The buffer solutions used in each row were diluted on an automated pipetting system (Tecan 100 RST). The stock solution for the buffers was made from 500 mM glycine acidified with HCl to pH 3.0, and subsequently neutralized with 2 M Tris Base to the pH levels indicated in **Table 9**. This titration resulted in a level of Tris that depended upon the pH of the buffer. The buffer pH was measured at a 1 to 10 dilution of the stock buffer concentration, which corresponded to the dilution made by the automated pipetting system. As a result

of the glycine acidification to pH 3.0, the buffer contributes about 10 mM of ionic strength to the final solution. Two load (load fluid) challenges were made to the resin: 5 mg/mL to measure the partition coefficient, K_p , and 122 mg/mL to measure the capacity of the resin for removal of impurities and the bound product, Q , in equilibrium with a protein solution at a concentration approximately equal to the column load concentration.

Table 9: Buffer type and pH Target in Each Well

	All columns
A	50mM Glycine, 8.8mM Tris, pH 7.6
B	50mM Glycine, 13.6mM Tris, pH 7.8
C	50mM Glycine, 16.0mM Tris, pH 8.0
D	50mM Glycine, 19.6mM Tris, pH 8.2
E	50mM Glycine, 28.4mM Tris, pH 8.4
F	50mM Glycine, 37.2mM Tris, pH 8.6
G	50mM Glycine, 64.0mM Tris, pH 8.8
H	50mM Glycine, 100mM Tris, pH 9.0

Table 10: NaCl levels (in mM) and Protein Challenges (mg/mL) in Each Well

All Rows	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
Mab-AAB (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

[0158] In the first stage of the high-throughput screen, each well was equilibrated in the conditions of NaCl and pH as described in **Tables 9 and 10** in a phase volume ratio of 6:1 (300 uL solution: 50 uL resin). The plate was shaken for 20 minutes, allowing equilibrium to be reached. The solution was then removed by centrifuging the filter plate. This equilibration cycle was repeated three times.

[0159] In the second stage, the resin in each well was challenged with a concentrated Mab-AAB solution to 5 mg/mL of resin with a volume ratio of 6:1 (300 uL solution: 50 uL resin) at the appropriate NaCl concentration and pH. A 36 mg/mL solution of Mab-AAB in 1 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.0 spiked with 300 ppm of Protein A was used as stock solution. The loaded plate was shaken for 20 minutes, allowing the resin and solution to equilibrate. The

supernatant was removed from the filter plate by centrifugation and collected into a collection plate. The protein concentration in the supernatant in each well was determined by absorbance at A280nm.

[0160] In the third stage, resin was washed by adding solutions of the specified NaCl and pH conditions listed in **Table 10**. The supernatant was removed after shaking for 20 minutes. In the fourth stage, 2 M NaCl was added to remove the remaining protein that was bound to the resin. The partition coefficients were calculated for each well using the mass eluted from stages 3 and 4 and the product concentration from stage 2, and are shown in **Table 11**.

Table 11: Partition Coefficients (Kp) for the 96-well HTS Screen for MAb-AAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.22	0.32	0.35	0.17	0.24	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.17	0.16
B	0.37	0.36	0.38	0.25	0.24	0.08	0.28	0.26	0.22	0.24	0.18	0.16
C	0.63	0.48	0.47	0.27	0.15	0.20	0.31	0.28	0.26	0.20	0.23	0.16
D	1.24	1.12	0.68	0.36	0.30	0.17	0.42	0.39	0.34	0.23	0.23	0.18
E	3.24	1.89	1.05	0.59	0.35	0.15	0.68	0.58	0.41	0.29	0.21	0.18
F	8.37	3.37	1.56	0.61	0.31	0.32	0.87	0.74	0.51	0.32	0.25	0.21
G	18.36	9.49	3.16	0.82	0.49	0.34	0.91	0.88	0.69	0.39	0.24	0.20
H	125.73	23.79	6.58	1.23	0.58	0.43	1.18	1.02	0.78	0.42	0.27	0.24

[0161] As shown in **Table 11**, the Kp value can be used to describe regions where MAb-AAB binds to the TMAE medium with different strengths. The strength of MAb-AAB binding to the TMAE medium can be manipulated by varying conditions of pH and chloride concentration into flow-through ($K \leq 0.1$), weak partitioning ($0.1 < K < 20$), and binding zones ($K \geq 20$).

[0162] The supernatant from the load stage of all wells from each zone were sampled and submitted for Protein A analysis. The assay results of these samples are summarized in **Table 12**. There is a region of pH and conductivity in which the TMAE chromatography step provides very significant removal of Protein A with limited protein loss to the resin. This region was found to be closely correlated to the partition coefficient value, Kp, and not any specific pH or chloride concentration.

Table 12: Protein A Log Removal Values (LRV) for MAb-AAB binding data from HTS Screen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.11	1.89	2.12	1.85	1.22	1.00	1.63	1.02	1.00	0.92	0.85	1.02
B	2.79	2.37	2.42	1.96	1.23	1.13	1.77	1.81	1.22	0.85	0.94	1.52
C	>3.05	>3.03	2.74	2.16	1.37	1.11	2.25	2.15	1.96	1.16	1.06	0.95
D	>3.41	>2.98	>3.06	2.50	1.94	1.18	3.39	3.11	2.57	1.41	1.02	0.89
E	>2.87	>2.93	>3.01	>2.95	2.13	1.75	>3.09	3.27	3.09	1.66	1.89	0.99
F	>2.64	>2.89	>2.99	>3.11	2.29	1.82	>3.07	>3.11	>3.15	2.19	1.24	0.84
G	>2.33	>2.58	>2.89	>3.07	2.41	2.14	>3.09	>3.11	>3.14	2.80	1.46	0.85
H	>1.63	>2.36	>2.76	>3.01	2.86	2.37	>2.98	>3.05	>3.15	3.16	3.45	0.85

Example 7.2. Column runs under flow-through conditions

[0163] The following experiment was performed in the flow-through (FT) mode, where the MAb-AAB interacts only very weakly with the column. Two runs were performed with load challenges of 110 mg/ml and 200 mg/ml of resin.

[0164] For all TMAE (HiCapM) anion exchange chromatography runs described, the following conditions were used (exceptions are noted in the individual experimental descriptions).

Operational flow rate – 150-300 cm/hr

Equilibration 1 – 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

Equilibration 2 – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Post-load wash – as specified, approximately equivalent to the load pH and chloride content

Strip buffer - 50 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.5 (5 column volumes)

Mabselect Protein A Chromatography

[0165] The culture containing the monoclonal antibody was purified at Pilot scale using a MabSelect column (2,389 mL) connected to a Millipore K-prime 400 chromatography system. A Mabselect Protein A column was equilibrated with 5 column volumes of 50 mM Tris / 150 mM NaCl, pH 7.5 at a flow rate of 300 cm/hr. The column was then loaded at a load of approximately 40 mg product / ml resin. This was followed by a 5 column volume (CV) wash in 1 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, and a 5CV wash containing 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7.5 wash. The column was then eluted using 50 mM glycine, 75 mM NaCl, pH 3.0. The product pool was neutralized to pH 7.6 using 2 M Tris, pH 8.5. The neutralized peak had a chloride concentration of approximately 90 mM.

TMAE HiCap (M) Chromatography

[0166] The neutralized Protein A pool was further purified over the TMAE step with the equilibration, load, and wash solutions at pH 7.5 with 50 mM Tris and 75 mM sodium chloride. Five column volumes of wash were used. The column dimensions and load challenges for these two studies were: Run 1: 7.0 cm diameter x 20.6 cm bed height (volume – 793 mL) with a load concentration of 11.9 mg/mL; and Run 2: 7.0 cm diameter x 13 cm bed height (volume – 500 mL) with a load concentration of 17.6 mg/mL.

[0167] These load conditions were in the flow-through (FT) region (Table 13). Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp), and the bound product was determined by protein in the column strip by using UV absorbance. This method of determining the bound product typically underestimates the amount of product bound during the load due to isocratic elution of the product during the wash. The levels of Protein A, HCP and high molecular weight aggregates (HMW) in the load and product pool were measured, and the extent of removal calculated. The results are presented in Table 13. There is poor removal of Protein A and HMW, and modest reduction in HCP levels.

Table 13: Removal of HCP, Protein A, and HMW under FT Conditions

Run	Load Challenge (mg/mL)	Partition Coefficient (Kp)	Bound Product (mg/mL resin)	HCP (LRV)	Protein A (LRV)	HMW (Fold)	Recovery (%)
1	110	0.17	1.4	2.3	0.1	-	96
2	200	0.17	3.3	2.0	<0.1	1.5	96

* Impurity levels were 38.5 ppm ProA and 51,943 ppm HCP (Run 1), 8.8 ppm ProA and 25,398 ppm HCP (Run 2).

Example 7.3. Column runs under weak partitioning conditions (high product challenge)

TMAE (HiCap M) Anion Exchange Chromatography

[0168] Several Mabselect Protein A runs were performed essentially as described in Example 7.2 to generate the load material for these runs. The partially purified antibody pool from the Protein A step was further purified over the TMAE column. The load to the TMAE column was in 50 mM Tris, pH 8.2.

The column diameter was 0.5 cm and the bed height was 10 cm bed height (volume – 2.0 mL). The column was challenged to a load of 500 mg/mL resin, with a load concentration of 27.7 mg/mL.

[0169] The column was equilibrated with 5CV of a solution containing 50 mM Tris, 2M NaCl, pH 7.5 followed by another equilibration step comprising a 50 mM Tris, pH 8.2 solution. The column was then loaded to 500 mg product / ml resin with the neutralized Protein A peak from the previous step and the product was recovered in the column effluent during the load cycle and some column volumes of the wash fraction.

[0170] These load conditions are in the weak partitioning region. Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp), and product binding at high protein concentrations. At pH 8.2, and an approximate chloride content of 12 mM, the partition coefficient, Kp, is estimated to be 1.9 (from interpolation of the dataset from the HTS screen).

[0171] The levels of HCP and Protein A were measured in three fractions during the loading stage representing load challenges of approximately 250, 375, and 500 mg/ml of resin. The results from example 7.3 are presented in **Table 14**. These results demonstrate that very high product challenges can be achieved in weak partitioning mode, without breakthrough of impurities. Excellent reduction in both HCP and Protein A was achieved, along with a 50% reduction in HMW content. In comparison to the results for operation in the flow-through mode in **Table 13**, the removal of impurities was much better in the weak partitioning mode.

Table 14: Removal of HCP, Protein A and HMW for a 500 mg/ml TMAE load challenge

	Early fraction (250 mg/ml)	Middle fraction (375 mg/ml)	Late fraction (500 mg/ml)	Final product pool (ppm)
Residual HCP ppm (ng/mg product)	< 7.6	< 7.6	< 7.6	< 7.6
HCP Log Removal Value (LRV)	> 3.5	> 3.5	> 3.5	> 3.5
Residual Protein A ppm (ng/mg product)	0.3	Not determined	0.1	0.6
ProA Log Removal Value (LRV)	2.9	Not determined	2.3	2.5
HMW	Not determined	Not determined	Not determined	2 fold removal

* The impurities in the load were 25,398 ppm of HCP, 99.5 ppm of Protein A, and 2.3% HMW

Example 7.4. Column runs under weak partitioning conditions (robustness studies)

[0172] To further confirm the performance of the TMAE column in the region of weak partitioning, several runs were designed varying the pH and NaCl concentration in the load to test process robustness. All runs were performed at a load challenge of 250 mg/ml resin. Several Mabselect Protein A runs were performed essentially as described in Example 7.2 to generate the load material for these runs. The only factor varied in those runs was the sodium chloride concentration in the Protein A elution, which was varied to match the NaCl concentration in the TMAE load for a particular experiment. The columns were equilibrated with Equil 2 buffers and washed with Wash buffers which had approximately the same pH and sodium chloride content of the load.

[0173] These load conditions are in the weak partitioning region. Batch binding studies were used to measure the partition coefficient (Kp). The runs are ranked by the partition coefficients listed in **Table 15**. The bound product was determined by measuring the protein in the column strip using UV absorbance, and ranges from 7.8–25.3 mg/mL. Protein A, HCP and HMW results from these experiments are also presented in **Table 15**. The removal of all impurities was found to be robust in operating ranges which cover 13.5–38.8 mM total chloride and pH 7.8–8.4.

Table 15: Process Robustness Studies on Removal of HCP, Protein A, and HMW in WP Mode

NaCl Concentration (mM)	Kp	Bound Product (mg/mL)	pH	HCP in Load (ppm)	Protein A in load (ppm)	HCP (LRV)	Protein A (LRV)	HMW (Fold)	Recovery (%)
38.8	0.26	9.4	7.8	26,391	493.5	3.7	1.8	2.0	92
13.5	0.41	7.9	7.8	12,821	69.2	3.3	>1.9	1.8	87
27.4	0.50	8	8.0	23,465	252	3.6	2.2	3.2	91
18.5	0.73	7.8	8.0	21,626	308	3.7	>3.2	2.9	90
23.5	0.80	9.5	8.1	18,004	343	3.2	>3.2	3.5	94
27.7	0.86	9.5	8.2	24,821	280	3.6	>3.2	2.6	99
18.5	1.48	10	8.2	17,669	252	3.7	>3.1	3.9	95
22.0	5.35	25.3	8.4	29,293	533	3.6	>2.9	2.3	90

* Impurity levels were 38.5 ppm ProA and 51,943 ppm HCP (Run 1), 8.8 ppm ProA and 25,398 ppm HCP (Run 2).

+ includes the Cl⁻ ion contribution from NaCl, buffers and titrants

Example 7.5. Summary

[0174] From these studies, it can be seen that Protein A removal (LRV) varies strongly with Kp, while HCP LRV is excellent at all the values of Kp at or above 0.26, but much reduced at Kp = 0.17 (under flow-through conditions). Host cell protein removal is over one log lower for flow-through conditions compared to weak partitioning conditions, even for a reduced load challenge. The bound product ranges from 7.8–25 mg/ml for these weak partitioning conditions on this combination of resin and monoclonal antibody. The partition coefficient appears to be optimal between 0.41 < Kp < 5.4. It does not appear to be optimal at Kp = 0.17 and a bound product of 1.4–3.3 mg/mL, the conditions of Example 7.2.

[0175] These studies suggest an alternative mode of purifying a polypeptide produced using rational design media cell culture, which will significantly reduce the presence of impurities, high molecular weight aggregates, DNA, host cell proteins, etc.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of producing a polypeptide in a cell culture comprising:
 - (1) providing a cell culture, comprising:
 - a. cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and
 - b. a desired cell culture medium, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest; and
 - (2) maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest.
2. A method of producing a polypeptide in a cell culture comprising:
 - (1) providing a cell culture, comprising:
 - a. cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and
 - b. a desired cell culture medium, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest, both of which concentrations are multiplied by a baseline factor; and
 - (2) maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest.
3. A method of producing a polypeptide in a cell culture comprising:
 - (1) providing a cell culture, comprising:
 - a. cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and
 - b. a desired cell culture medium, comprising a baseline-adjusted amino acid concentration, A, according to the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the

amino acid that is used per unit of cell mass, P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor; and

- (2) maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest.

4. The method of claim 3, further comprising a method of recovering a purified polypeptide from a load fluid, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium in a column at operating conditions that cause the medium to bind at least 2.8 mg of polypeptide per mL of medium, wherein the medium is selected from the group consisting of a charged ion exchange medium, a hydrophobic interaction chromatography resin, and an immobilized metal affinity chromatography resin; and

recovering the purified polypeptide from the column effluent.

5. The method of claim 3, further comprising a method of recovering a purified polypeptide from a load fluid, comprising the steps of:

passing the load fluid through a medium in a column at operating conditions defined by a partition coefficient of at least 0.1; and

recovering the purified polypeptide from the column effluent.

6. A method of producing a polypeptide in a cell culture comprising:

- (1) providing a cell culture, comprising

- a. cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and

- b. a starting cell culture medium, wherein the volume of the starting cell culture medium is about 60–99% of the volume of a desired cell culture medium volume;

- (2) providing a feeding cell culture medium to the cell culture according to step (1), wherein the volume of the feeding cell culture

medium is about 1–40% of the desired cell culture medium volume, and wherein the resulting desired cell culture medium comprises a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest; and

(3) maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest.

7. A method of producing a polypeptide in a cell culture comprising:

- (1) providing a cell culture, comprising
 - a. cells, comprising a nucleic acid encoding a polypeptide of interest; and
 - b. a starting cell culture medium, wherein the volume of the starting cell culture medium is about 60–99% of the volume of a desired cell culture medium volume;
- (2) providing a feeding cell culture medium to the cell culture according to step (1), wherein the volume of the feeding cell culture medium is about 1–40% of the desired cell culture medium volume, and wherein the resulting desired cell culture medium comprises a baseline-adjusted amino acid concentration, A, according to the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor; and
- (3) maintaining the cell culture under conditions that allow expression of the polypeptide of interest.

8. The method of claim 7, wherein the starting cell culture medium comprises a concentration, B, of the amino acid according to the formula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, wherein Z is a concentration of the amino acid in the feeding cell culture medium, and V is a volume of the feeding culture medium as a proportion of the desired cell culture medium volume.
9. The method of any one of claims 3, 4, 5, 7, and 8, wherein Y is 0 to about 1.5.
10. The method of any one of claims 3, 4, 5, 7, and 8, wherein F is about 1 to about 1.5.
11. The method of any one of claims 3, 4, 5, 7, and 8, wherein Y is 0 to about 1.5 and F is about 1 to about 1.5.
12. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises greater than or equal to about 3 mM tyrosine.
13. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises between about 7 mM and about 30 mM leucine.
14. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises between about 7 mM and about 30 mM lysine.
15. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises between about 7 mM and about 30 mM threonine.
16. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises between about 7 mM and about 30 mM proline.
17. The method of any one of claims 1-11, wherein the desired cell culture medium comprises between about 7 mM and about 30 mM valine.

18. The method of any one of claims 1-11, wherein the combined concentration of leucine, lysine, threonine, proline, and valine in the desired cell culture medium is between about 35 mM and about 150 mM.

19. The method of any one of claims 1-11, wherein the combined concentration of leucine, lysine, threonine, and valine in the desired cell culture medium is between about 60% and about 80% of the concentration of the total essential amino acids in the desired cell culture medium.

20. The method of any one of claims 1-11, wherein the combined concentration of the essential amino acids in the desired cell culture medium is between about 30% and about 50% of the concentration of the total amino acids in the desired cell culture medium.

21. The method of any one of claims 1-11, wherein the concentration of amino acids in the desired cell culture medium is between about 120 mM and about 350 mM.

22. The method of any one of claims 1-11, wherein the concentration of proline in the cell culture is maintained at greater than about 1 mM.

23. The method of any one of claims 1-11, wherein the concentration of proline in the cell culture is maintained at greater than about 2 mM.

24. The method of any one of claims 1-23, wherein the cell culture is a large-scale cell culture.

25. The method of any one of claims 1-23, wherein the cells are animal cells.

26. The method of any one of claims 1-3 and 6-25, wherein the polypeptide is purified.

27. The method of any one of claims 1-26, wherein the medium is a defined medium.
28. A polypeptide produced according to the method of any one of claims 1-27.
29. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide as set forth in claim 28 and a pharmaceutically acceptable carrier.
30. A method of cell culture comprising:
- (1) providing a cell culture, comprising:
 - a. cells; and
 - b. a desired cell culture medium, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass and a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance; and
 - (2) maintaining the cell culture under conditions that allow growth and replication of the cells in the cell culture.
31. A method of cell culture comprising:
- (1) providing a cell culture, comprising:
 - a. cells; and
 - b. a desired cell culture medium, comprising a baseline-adjusted amino acid concentration, A' , according to the formula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, M is a multiplier for a desired peak cell density of the cell culture, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor; and
 - (2) maintaining the cell culture under conditions that allow growth and replication of the cells in the cell culture.
32. The method of claim 30 or 31, wherein the cell culture is a large-scale cell culture.

33. The method of claim 30 or 31, wherein the cells are animal cells.
34. A cell culture medium, comprising a total concentration of amino acids from between about 120 mM and about 350 mM.
35. A cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest, comprising a total concentration of amino acids from between about 120 mM and about 350 mM.
36. A cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest, comprising a concentration of an amino acid that is calculated for use in cell mass, a concentration of the amino acid that is calculated for use in cell maintenance, and a concentration of the amino acid that is calculated for incorporation into the polypeptide of interest.
37. A cell culture medium, comprising a baseline-adjusted amino acid concentration, A' , according to the formula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, M is a multiplier for desired peak cell density of the cell culture, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor.
38. A cell culture medium for use in the production of a polypeptide of interest, comprising a baseline-adjusted amino acid concentration, A , according to the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, wherein X is a concentration of the amino acid that is used per unit of cell mass, P is a concentration of the amino acid that is used for incorporation into the polypeptide of interest per unit of polypeptide titer, M is a multiplier for desired peak cell density of the cell culture, N is a multiplier for desired concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor, and F is a baseline factor.
39. The cell culture medium of any one of claims 34-38, wherein the cell culture medium is a large-scale cell culture medium.

40. The cell culture medium of any one of claims 34-38, wherein the cell culture medium is an animal cell culture medium.

41. The cell culture medium of any one of claims 34-40, wherein the cell culture medium is a defined medium.

42. A method for determining an optimized concentration of an amino acid used in a cell culture medium for the production of a polypeptide of interest in a cell culture, comprising:

- (1) determining the amino acid concentration required for the cell mass of the cells at a target cell density;
- (2) determining the amino acid concentration required to produce the polypeptide of interest at a target polypeptide titer;
- (3) determining the amino acid concentration required for cell maintenance of the cells; and
- (4) adding the concentrations obtained from step (1), step (2), and step (3) to provide an optimized concentration of the amino acid used in the cell culture medium for the production of the polypeptide of interest.

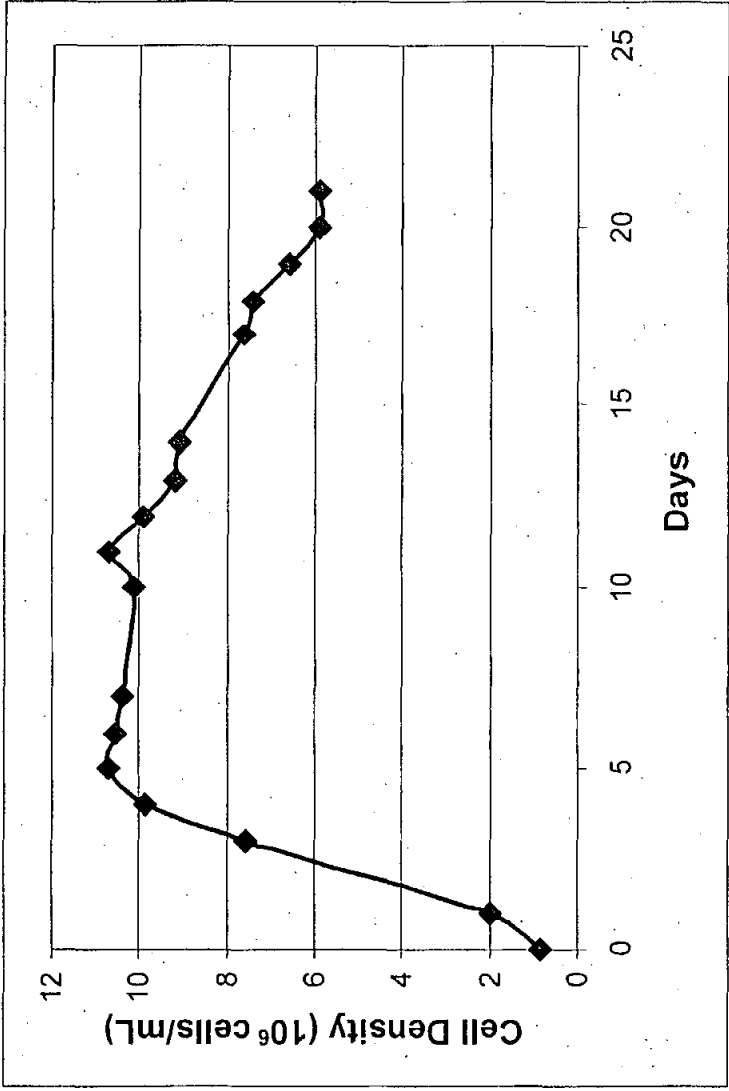
43. A method for determining an optimized amino acid concentration, A, of an amino acid used in a cell culture medium for the production of a polypeptide of interest in a cell culture, comprising:

- (1) determining the amino acid concentration, X, required for the cell mass of the cells at a set cell density;
- (2) determining the amino acid concentration, P, required to produce the polypeptide of interest at a set polypeptide titer; and
- (3) determining the optimized amino acid concentration, A, according to the formula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (M \cdot Y \cdot X)] \cdot F$, wherein M is a multiplier for a desired target cell density of the cell culture, N is a multiplier for a desired target concentration of the polypeptide of interest, Y is a cell maintenance factor; and F is a baseline factor.

44. The method of claim 42 or 43, wherein the cell culture is a large-scale cell culture.

45. The method of claim 42 or 43, wherein the cell culture is an animal cell culture.

Figure 1



000.85

Figure 2

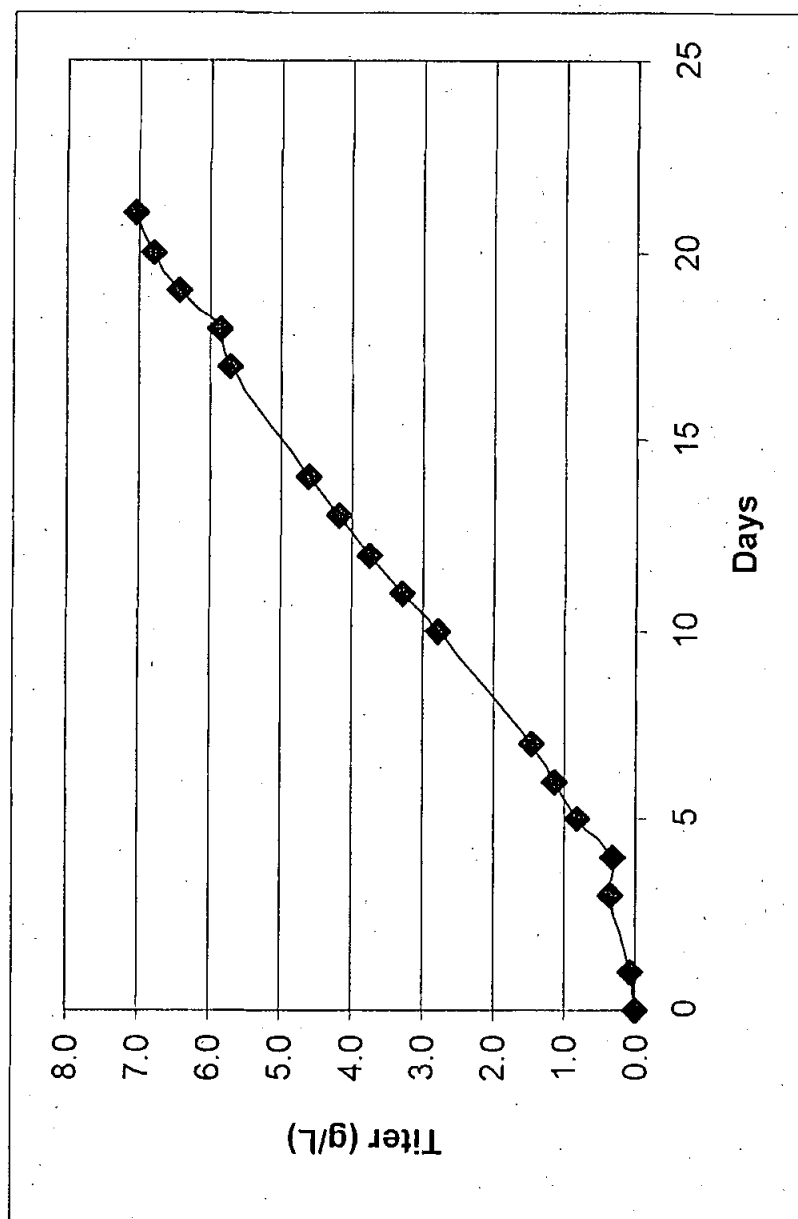
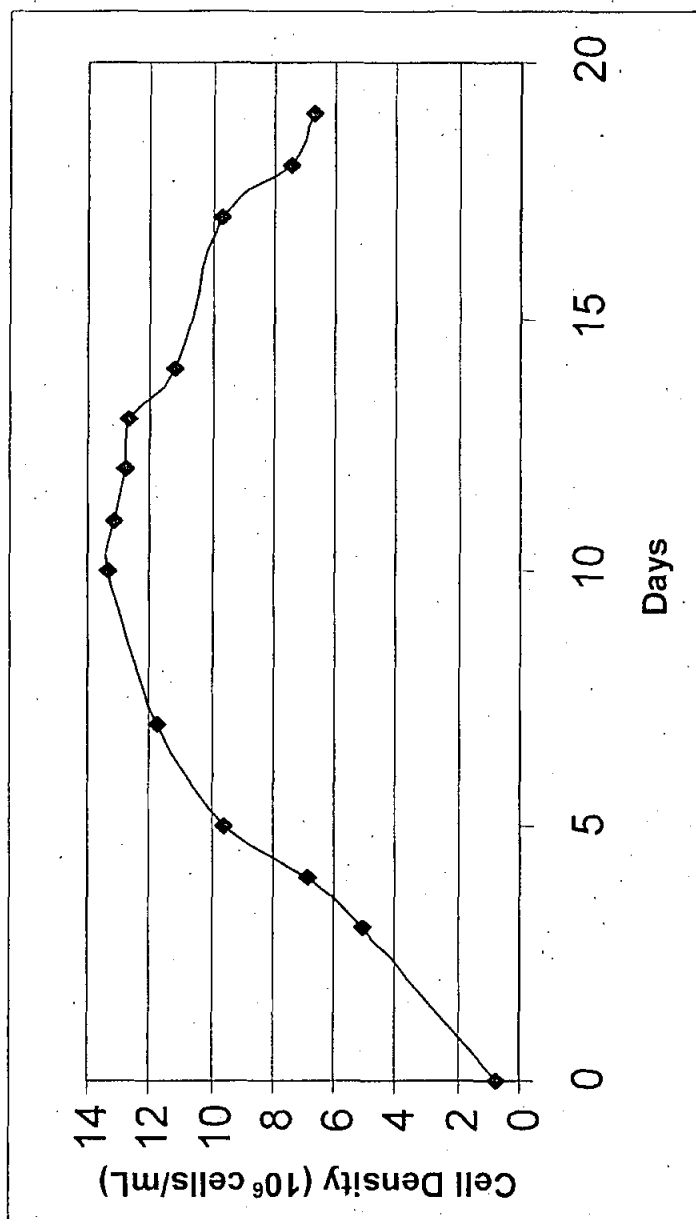


Figure 3



000 85

- 000 87

Figure 4

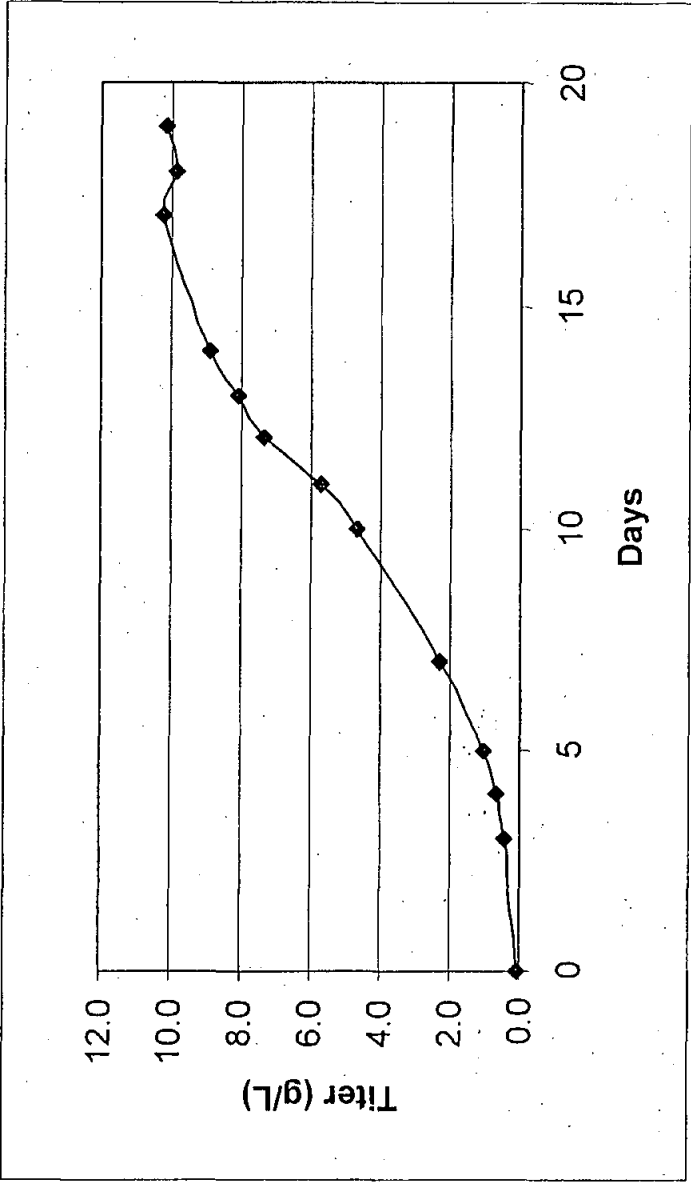


Figure 5

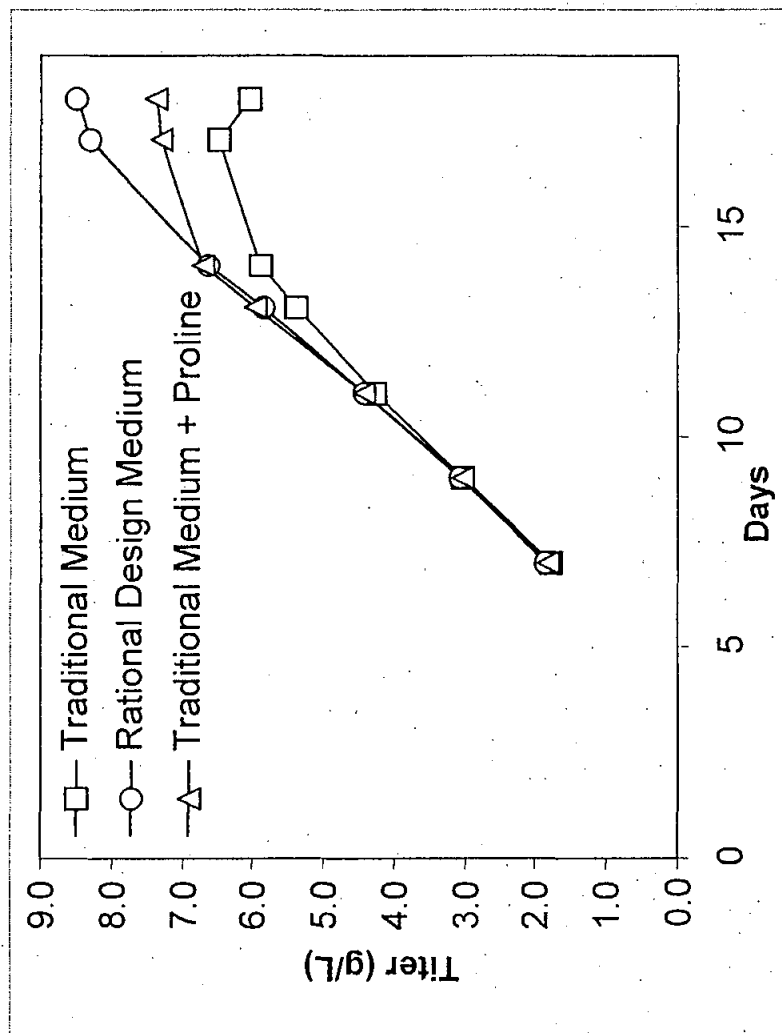


Figure 6

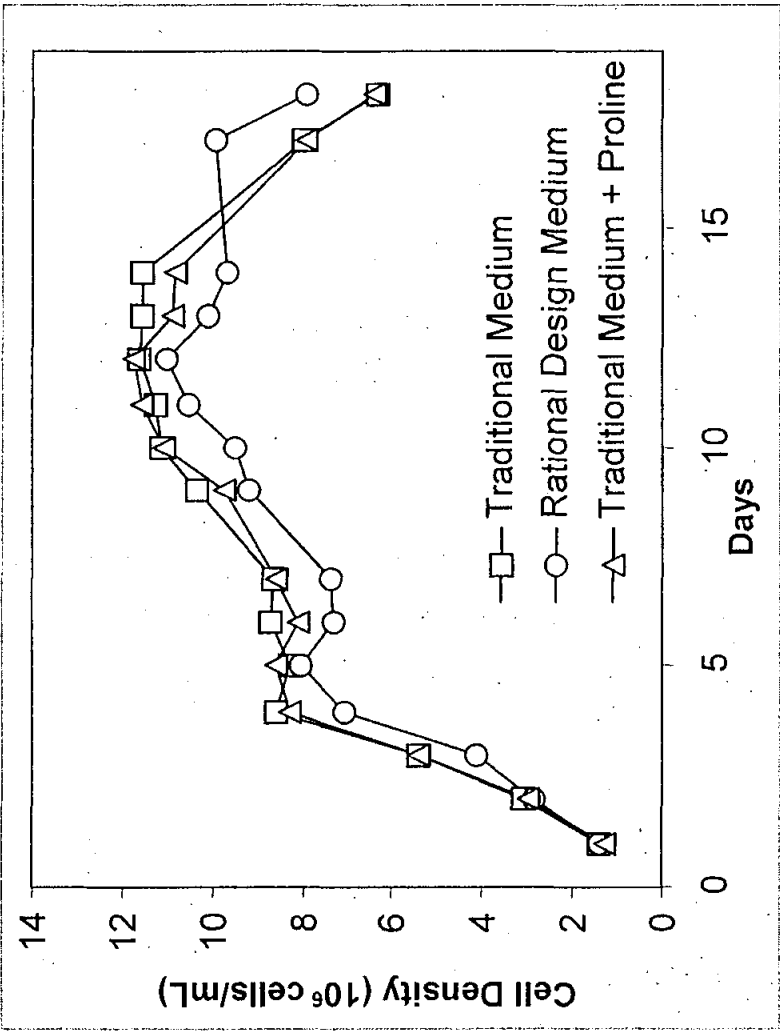


Figure 7

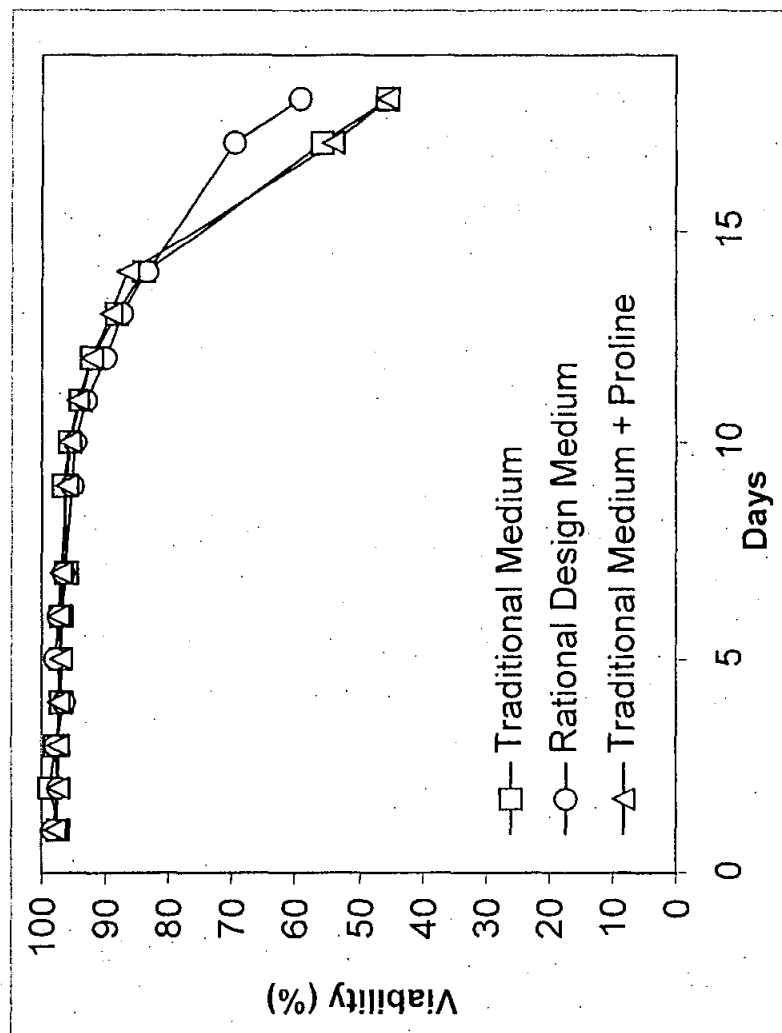


Figure 8A

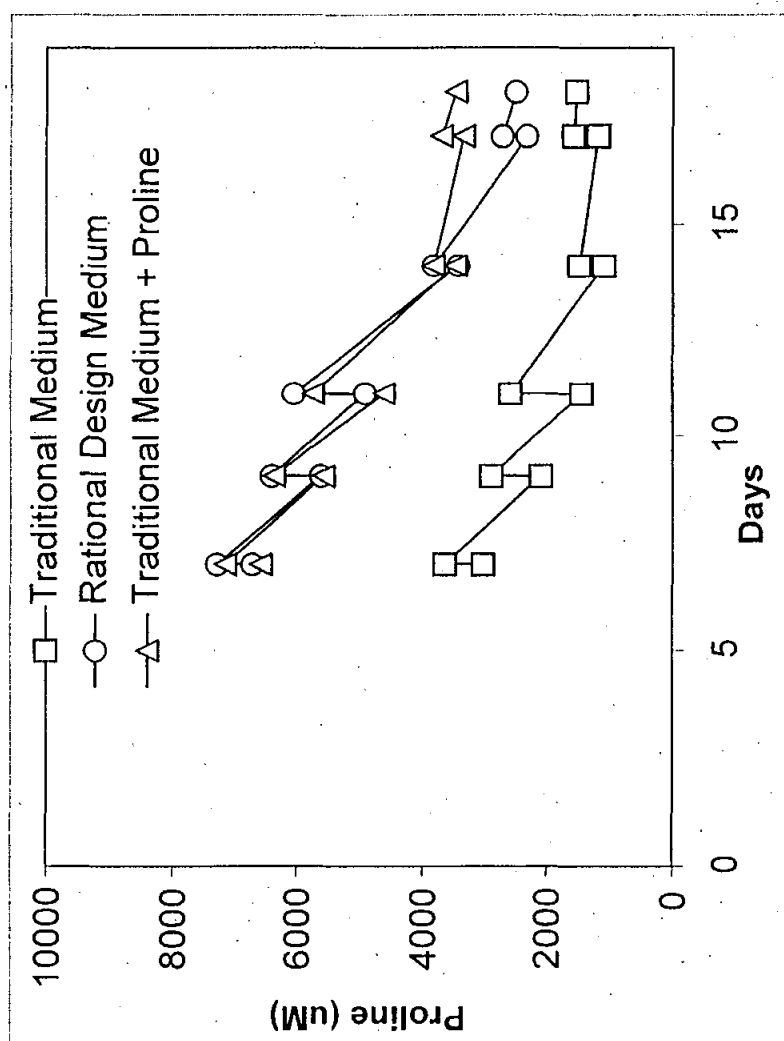
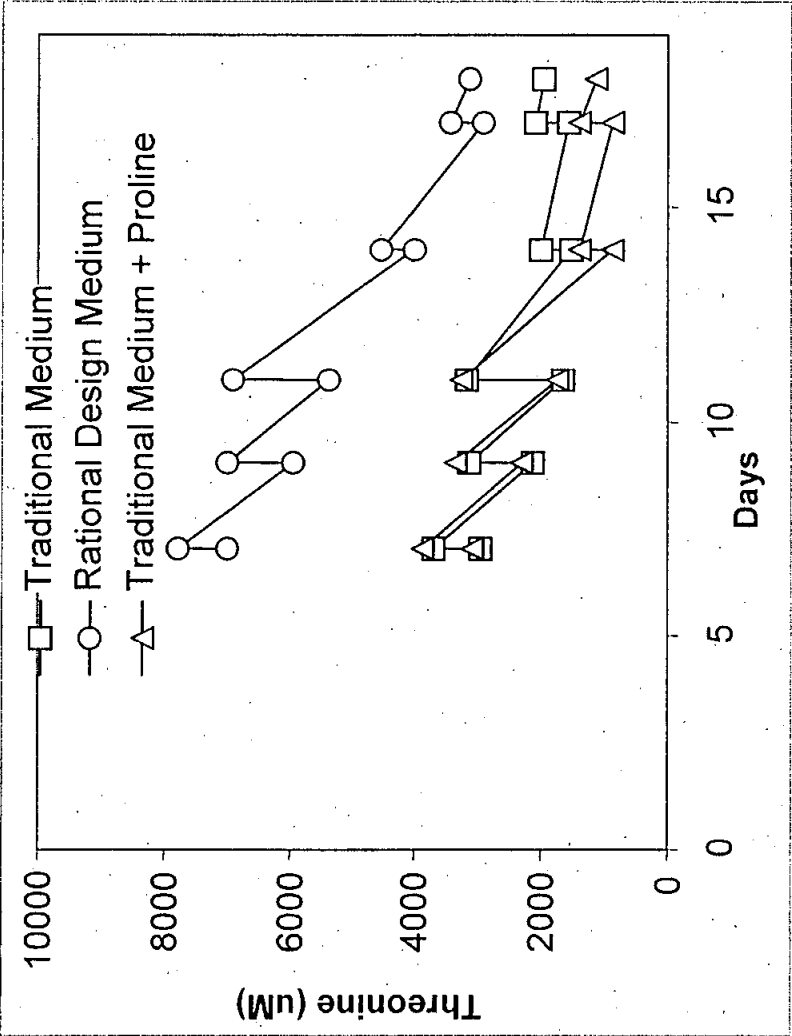
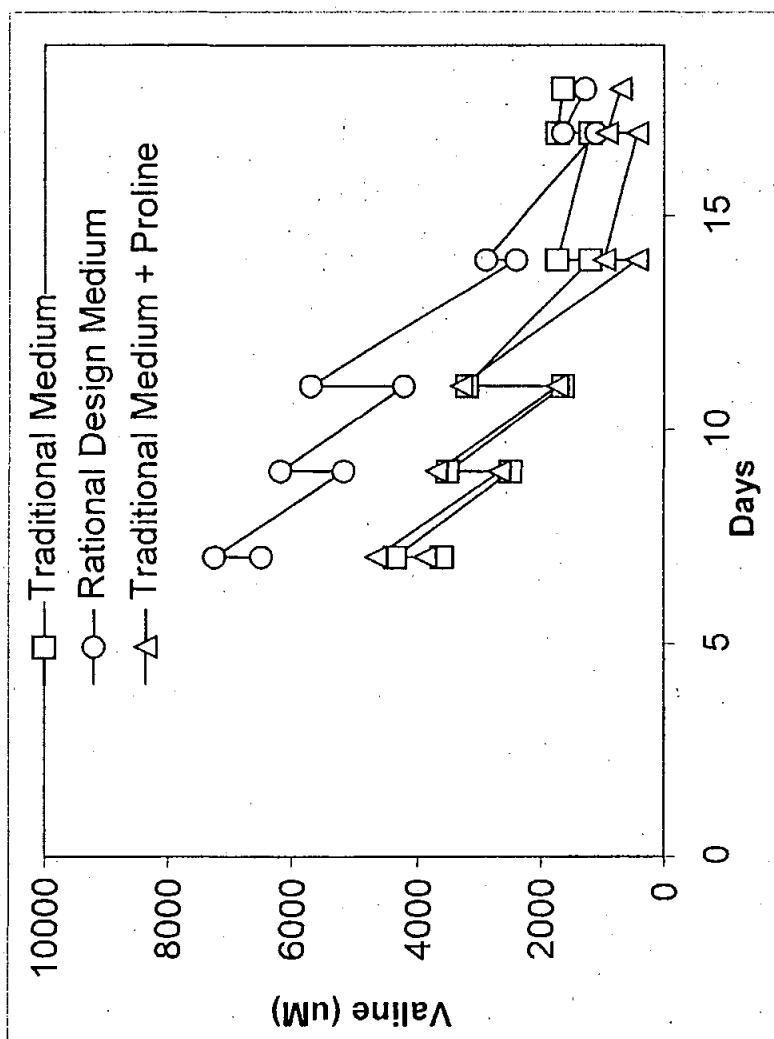


Figure 8B



600.93

Figure 8C



11/15

Figure 8D

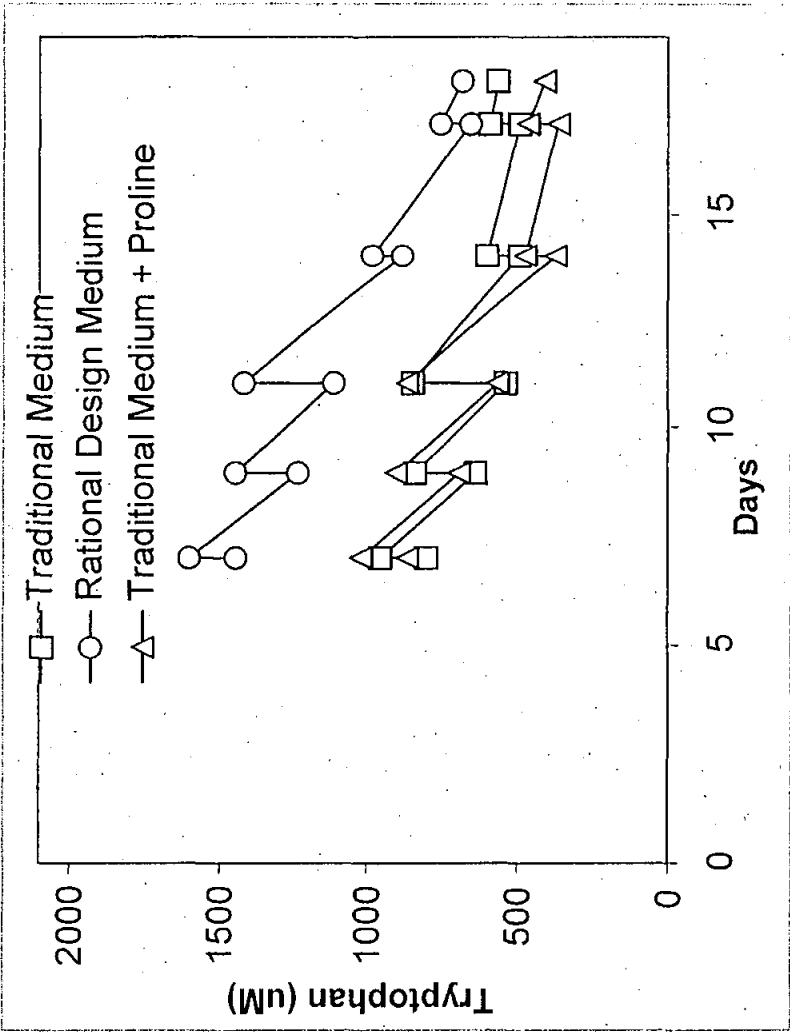


Figure 8E

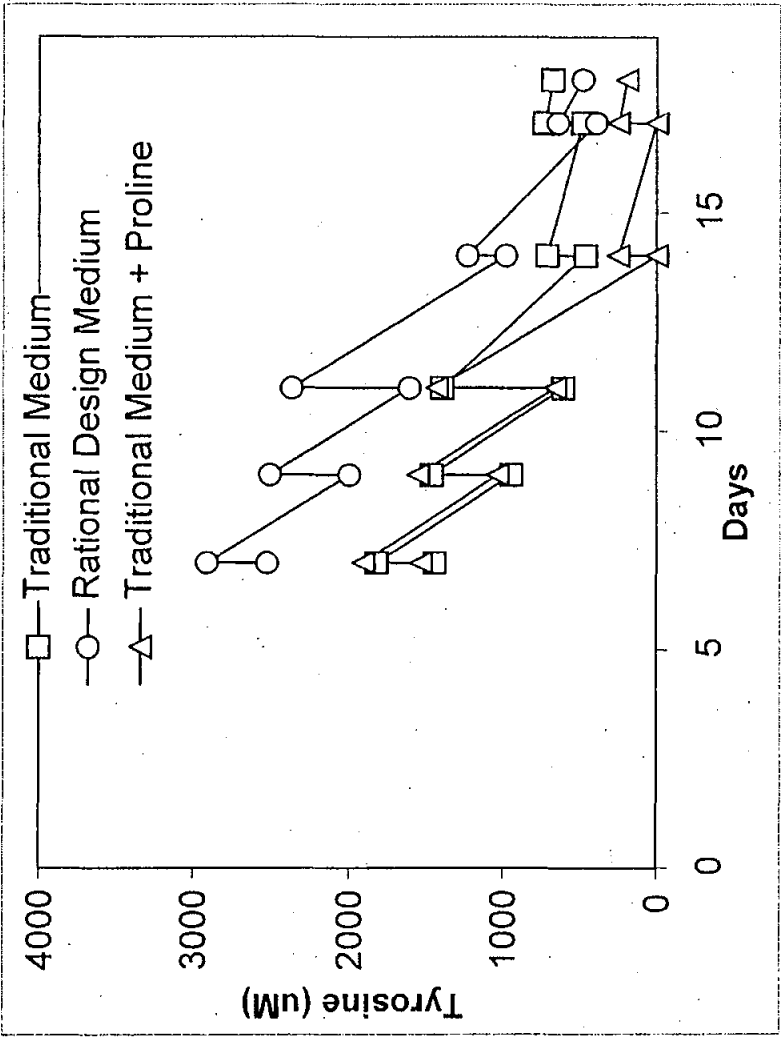


Figure 9

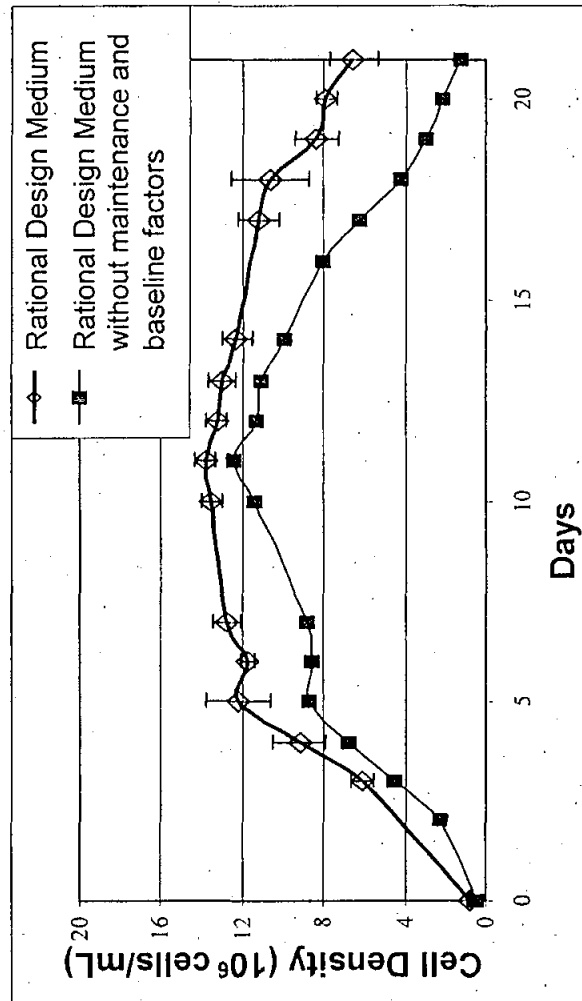


Figure 10

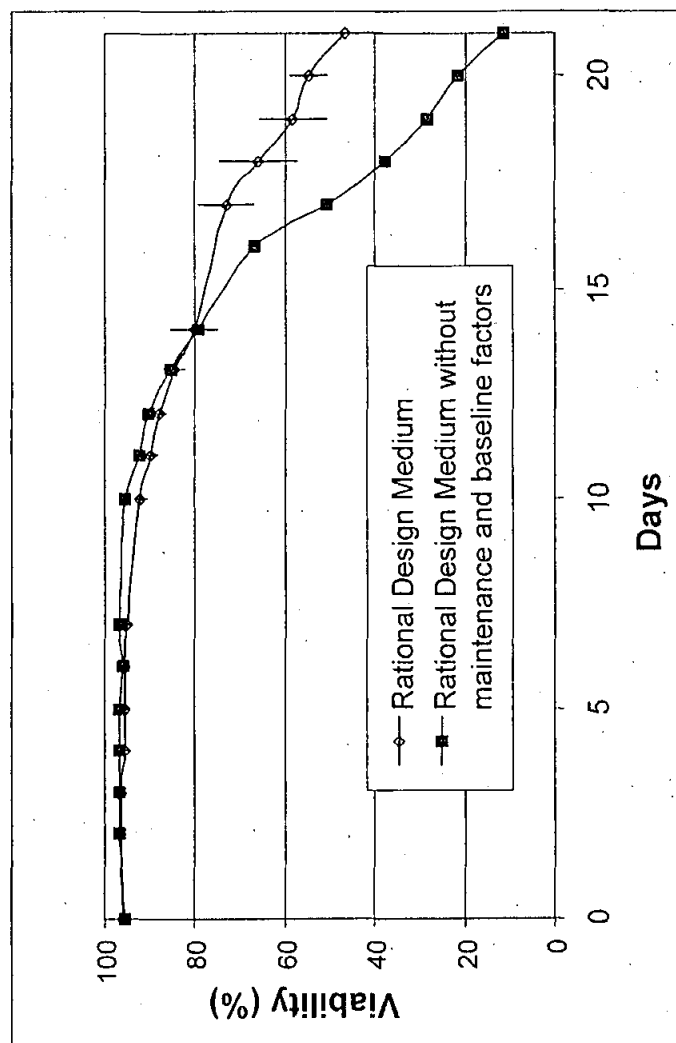
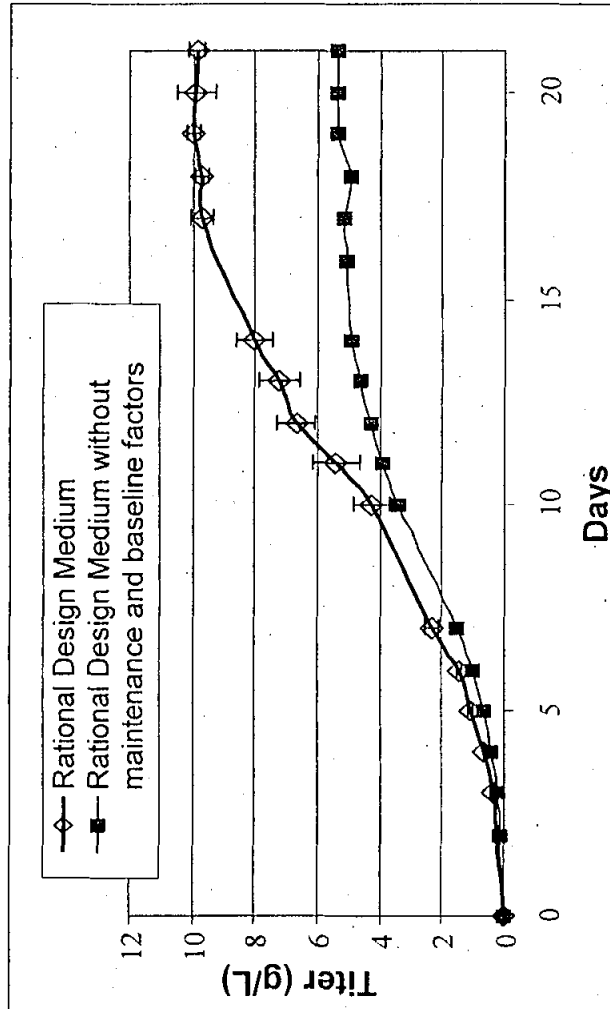


Figure 11



MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO CELULAR

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

5 Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 60/858,289, presentada en Noviembre 8, 2006, cuyo contenido se incorpora aquí
10 como referencia en su totalidad.

Campo de la Invención

Esta invención se relaciona con métodos para diseñar
15 racionalmente medios de cultivos celular para uso en cultivos celulares empleados en, por ejemplo, producción de polipéptidos; los medios de cultivo celular diseñados con los métodos descritos; métodos para producir grandes cantidades de un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, utilizando
20 tales medios; polipéptidos producidos utilizando los métodos y los medios descritos aquí; y composiciones farmacéuticas que contienen tales polipéptidos. La invención es particularmente útil en cultivos celulares a gran escala. Los métodos y composiciones descritos aquí son particularmente útiles para
25 producir cantidades significativas de polipéptidos en tandas, tandas-alimentación y perfusión de cultivos celulares animales.

Técnica Antecedente Relacionada

Una gran proporción de productos de biotecnología, disponibles comercialmente o solo en desarrollo, son terapéuticos de proteínas; así, existe una demanda de producción de estos polipéptidos en cultivos celulares. Adicionalmente, la maquinaria celular de una célula animal (opuestos a, por ejemplo, una célula bacteriana) se requiere frecuentemente para producir muchas formas de terapéuticos de polipéptido (tal como proteínas glicosiladas o anticuerpos monoclonales producidos por hibridoma (MABs)). Por consiguiente, existe una demanda incrementada para optimizar la producción de estos polipéptidos en cultivos celulares, y particularmente en cultivos de células de animales.

Según se compara con los cultivos de células bacterianas, los cultivos de células animales tienen menor velocidad de producción y genera típicamente menores rendimientos de producción. Así, una cantidad significativa de investigaciones se enfocan en condiciones de cultivos de células animales que optimizan la salida de polipéptidos, es decir, condiciones que soportan la alta densidad celular y altos títulos. Por ejemplo, se ha determinado que mantener concentraciones de glucosa en medios de cultivos celulares a bajas concentraciones y cultivar células en una fase de producción en una osmolalidad de aproximadamente 400 a 600 mOsm incrementa la producción de las proteínas recombinantes por cultivos de células animales, en donde el cultivo en todas las fases también está en una concentración de glutamina seleccionada (preferiblemente entre aproximadamente 0.2 a aproximadamente 2 mM). También se ha determinado que la alimentación restringida de glucosa a los cultivos de células animales en procesos de tanda-alimentación controla la producción

de lactato sin requerir la alimentación a velocidad constante de glucosa. Adicionalmente, se sabe que la modificación de la concentración acumulada total de aminoácidos, la concentración de aminoácidos individuales, y las relaciones de aminoácidos individuales con cada uno (por ejemplo, glutamina a asparagina) y con aminoácidos totales (por ejemplo, glutamina a aminoácidos totales) en los medios de un cultivo celular a gran escala puede resultar en producción de polipéptidos a gran escala sustancialmente mejorada.

10

Tradicionalmente, los estudios de medio para cultivos de células animales se enfocan en tres técnicas: 1) enriquecer los componentes de medio del medio de partida e incrementar la frecuencia de alimentación de cultivo; 2) aplicar diseño multifactorial para fortalecer diferentes medios y diferentes concentraciones de componente; 3) analizar medio condicionado (gastado) para aminoácidos, vitaminas, y otros componentes, y agregar aquellos componentes que están en niveles bajos o están agotados. Estos métodos utilizan generalmente densidad celular, viabilidad y respuestas de título como indicadores de optimización.

20

Sin embargo, los anteriores métodos solo detectan indirectamente el requerimiento de nutriente para células basado en el resultado final, es decir, densidad celular, viabilidad, y título, a diferencia de detectar y proporcionar a la célula el requerimiento de nutriente actual para producción de proteína optimizada.

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para diseñar racionalmente medios de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo celular a gran escala, para uso en, por ejemplo cultivos de células a gran escala empleados en la producción de polipéptidos; medios de cultivo celular, por ejemplo medios de cultivo celular a gran escala, diseñado con los métodos descritos; métodos para producir grandes cantidades de un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, utilizando tales medios; polipéptidos producidos utilizando los métodos y medios descritos aquí; y composiciones farmacéuticas que contienen tales polipéptidos.

Estos métodos y composiciones son útiles para el cultivo, por ejemplo, tanda, tanda-alimentación, y cultivo de perfusión, de células. Estos métodos y composiciones son particularmente útiles para el cultivo a gran escala, por ejemplo, tanda, tanda-alimentación, y cultivo por perfusión, de células animales, por ejemplo, células de mamífero.

Un medio diseñado racionalmente de la presente invención contiene una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en el mantenimiento de la célula, y una concentración del aminoácido que se calcula para la incorporación en el polipéptido de interés.

En una modalidad, la invención proporciona un método para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende proporcionar un cultivo celular, que comprende células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, y un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés; y, mantener el cultivo celular bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En una modalidad de la invención, el medio de cultivo celular deseado comprende una concentración de aminoácido de valores iniciales ajustados, A, de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para producir un polipéptido en un cultivo celular, que comprende proporcionar un cultivo celular, que comprende células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y un medio de cultivo celular de partida, en donde el volumen del medio de cultivo celular de partida es de

aproximadamente 60-99% del volumen de un volumen de medio de cultivo celular deseado; proporcionar un medio de cultivo celular de alimentación al cultivo celular, en donde el volumen del medio de cultivo celular de alimentación es de aproximadamente 1-40% del volumen del medio de cultivo celular deseado, y en donde el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en el mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés; y, mantener el cultivo celular bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En una modalidad de la invención, el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de aminoácido de valores iniciales ajustados, A, de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial; y mantener el cultivo celular bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En otra modalidad de la invención, el medio de cultivo celular de partida comprende una concentración, B, del aminoácido de acuerdo con la fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1V)$, en donde Z es una concentración del aminoácido en el medio de cultivo celular de alimentación, y V es

000105

un volumen del medio de cultivo de alimentación como una proporción del volumen de medio de cultivo celular deseado. En otra modalidad de los métodos descritos aquí, Y es 0 a aproximadamente 1.5. En aún otra modalidad de los métodos descritos aquí, F es aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5. En una modalidad adicional de los métodos descritos aquí, Y es 0 a aproximadamente 1.5. y F es aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5.

- 10 En una modalidad de los métodos descritos aquí, el medio de cultivo celular deseado comprende más de o igual a aproximadamente 3mM de tirosina. En otra modalidad de los métodos descritos aquí, el medio de cultivo celular deseado comprende:
- 15 entre aproximadamente 7mM y aproximadamente 30mM de leucina; entre aproximadamente 7mM y aproximadamente 30mM de lisina; entre aproximadamente 7mM y aproximadamente 30mM de treonina; entre aproximadamente 7mM y aproximadamente 30mM de prolina; y/o aproximadamente 7mM y aproximadamente 30mM de valina. En una
- 20 modalidad adicional de los métodos descritos aquí, la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, prolina, y valina en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 35mM y aproximadamente 150 mM. En aún otra modalidad, la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, y valina en el medio de cultivo celular deseado está
- 25 entre aproximadamente 60% y aproximadamente 80% de la concentración de los aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular deseado.

En una modalidad de los métodos descritos aquí, la concentración combinada de los aminoácidos esenciales en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50% de la concentración de aminoácidos totales en el medio de cultivo celular deseado. En otra modalidad de los métodos descritos aquí, la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 120mM y aproximadamente 350 mM. En una modalidad adicional de los métodos descritos aquí, la concentración de prolina en el cultivo celular se mantiene en más de aproximadamente 1mM. En aún otra modalidad de los métodos descritos aquí, la concentración de prolina del cultivo celular se mantienen en más de aproximadamente 2mM. En algunas modalidades de los métodos de producción de un polipéptido, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otras modalidades, las células son células de animales.

Un aspecto adicional de la invención proporciona polipéptidos producidos de acuerdo con los métodos descritos aquí. Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido producido de acuerdo con los métodos descritos aquí y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método de cultivo celular que comprende: proporcionar un cultivo celular, que comprende: células; y un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular y una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular; y mantener el

cultivo celular bajo condiciones que permitan el crecimiento y la replicación de las células en el cultivo celular. En una modalidad de la invención, el medio de cultivo celular deseado comprende una concentración de aminoácido ajustado a valores
5 iniciales, A' , de acuerdo con la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, M es un multiplicador para una densidad celular de pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial. En
10 algunas modalidades de los métodos de cultivo celular, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otras modalidades, las células son células de animales.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un medio de
15 cultivo celular, que comprende una concentración total de aminoácidos de entre aproximadamente 120mM y aproximadamente 350mM. Otro aspecto de la invención proporciona un medio de cultivo celular para uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración total de aminoácidos de
20 entre aproximadamente 120mM y aproximadamente 350mM.

Otro aspecto de la invención proporciona un medio de cultivo celular para uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula
25 para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés. En una modalidad de la invención, el medio de cultivo celular para uso en la producción de un

polipéptido de interés comprende una concentración de aminoácidos ajustados a valores iniciales, A, de acuerdo con la fórmula $A=[(M \cdot X)+(N \cdot P)+(Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una
5 concentración del aminoácido que se utilizan para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento
10 celular, y F es un factor de valor inicial.

Aún otro aspecto de la invención proporciona un medio de cultivo celular, que comprende una concentración de aminoácido ajustado a valor inicial, A', de acuerdo con la fórmula $A'=[(M \cdot X)+(Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en
15 donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, M es un multiplicador para densidad celular pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de línea base. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo
20 celular a gran escala. En otras modalidades, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo de células animales.

25 Aún otro aspecto de la invención proporciona un método para determinar una concentración optimizada de un aminoácido utilizado en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende:

000179

determinar la concentración de aminoácidos requerida para la masa celular de la células en el medio de cultivos celular en una densidad celular objetivo; determinar la concentración de aminoácido requerida para producir el polipéptido de interés en el cultivo celular en un título de polipéptido objetivo; determinar la concentración de aminoácidos requerida para el mantenimiento celular de las células en el cultivo celular; y agregar las concentraciones para proporcionar una concentración optimizada del aminoácido utilizado en el medio de cultivo celular para la producción del polipéptido de interés en el cultivo celular.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para determinar una concentración de aminoácido optimizada, A, de un aminoácido utilizado en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende; determinar la concentración de aminoácido, X, requerida para la masa celular de las células en una densidad celular establecida; determinar la concentración de aminoácido, P, requerida para producir el polipéptido de interés en un título de polipéptido establecido; determinar la concentración de aminoácido optimizada, A, de acuerdo con la fórmula $A=[(M \cdot X)+(N \cdot P)+(Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde M es un multiplicador para una densidad celular objetivo deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración objetivo deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial. En algunas modalidades de los métodos para determinar una concentración de aminoácido

- 800110

optimizada, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otra modalidad, las células son células de animales.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

10 La Figura 1 describe la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/mL)") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en el medio diseñado racionalmente del ejemplo 2.

15 La Figura 2 describe el título (eje Y; "Título (g/L)") de anticuerpo anti IL-22 durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en el medio diseñado racionalmente del ejemplo 2.

20

La Figura 3 describe la densidad celular (eje Y; "densidad celular (10^6 células/mL)") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22.

25 Las células se cultivan en el medio diseñado racionalmente del ejemplo 3.

La Figura 4 describe el título (eje Y; "Título (g/L)") de anticuerpo anti IL-22 durante el tiempo (eje X; "Días") para

células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en el medio diseñado racionalmente del ejemplo 3.

5 La Figura 5 describe el título (eje Y; "Título (g/L)") de anticuerpo anti IL-22 durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "medio tradicional" (un medio basado en los requerimiento de cultivo celular tradicionales, ver, por
10 ejemplo, Solicitud de Patente Estadounidense Publicada No. 2006/0121568), "Medio de Diseño Racional" preparada utilizando los métodos aquí, o "Medio Tradicional + Prolina", que contiene un adicional de 3.7 mM de prolina agregada al "Medio Tradicional" (ver ejemplo 4).

15

La Figura 6 describe la densidad celular (eje Y; "densidad celular (10^6 células/mL)") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "El Medio Tradicional" "Medio de
20 Diseño Racional" o "Medio Tradicional + Prolina" (ver ejemplo 4).

La Figura 7 describe la viabilidad celular (eje Y; "Viabilidad [%]") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células
25 se cultivan en "Medio Tradicional", "Medio de Diseño Racional", o "Medio Tradicional + Prolina" (ver ejemplo 4).

La Figura 8 describe la concentración del aminoácido diseñado (eje Y; "[μ M]")(Figura 8A) prolina; (Figura 8B) treonina; (Figura

8C) valina; (Figura 8D) triptofan; o (Figura 8E) tirosina) durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "Medio Tradicional", "Medio de Diseño Racional", o "Medio Tradicional + Prolina" (ver ejemplo 4).

La Figura 9 describe la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/mL)") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "Medio de Diseño Racional", o "Medio de Diseño Racional sin mantenimiento y factores de valores iniciales". La Figura representativa de cinco réplicas independientes ($n=5$) (ver ejemplo 6).

La Figura 10 describe la viabilidad celular (eje Y; "Viabilidad [%]") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "Medio de Diseño Racional", o "Medio de Diseño Racional sin mantenimiento y factores de valores iniciales". La Figura representativa de 5 réplicas independientes ($n=5$) (ver ejemplo 6).

La Figura 11 describe título de anticuerpo (eje Y; "Título (g/L)") durante el tiempo (eje X; "Días") para células CHO construidas con ingeniería para expresar anti-IL-22. Las células se cultivan en "Medio de Diseño Racional", o "Medio de Diseño Racional sin mantenimiento y factores de valores iniciales". La

Figura representativa de 5 réplicas independientes (n=5) (ver ejemplo 6).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

El término "cultivo en tanda" como se utiliza aquí se refiere a un método para cultivar células en las que todos los componentes que se utilizaran finalmente en el cultivo en las células, incluyen el medio así como también las células mismas, que se proporcionan al inicio del proceso de cultivo. Un cultivo de tanda se detiene típicamente en algún punto y las células y/o componentes en el medio se cosechan y purifican opcionalmente.

10

El término "cultivo de tanda-alimentación" como se utiliza aquí se refiere a un método para cultivar células en las que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en algún momento posterior al inicio del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Un cultivo de tanda-alimentación se detiene típicamente en algún punto y las células y/o componentes en el medio se cosechan y purifican opcionalmente. En una modalidad preferida de la presente invención, el cultivo celular es un cultivo de células animales, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero, que es un cultivo de tanda o tanda-alimentación.

20

25

El término "cultivo de perfusión" como se utiliza aquí se refiere a un método para cultivar células en la que se proporcionan componentes adicionales continuamente o semicontinualmente al

cultivo posterior al inicio del proceso de cultivo. El componente proporcionado comprende típicamente complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Porciones de las células y/o componentes en el medio se cosechan típicamente en una base continua o semicontinua, y se purifican opcionalmente.

El término "biorreactor" como se utiliza aquí se refiere a cualquier recipiente utilizado para el crecimiento de un cultivo celular procariótico o eucariótico, por ejemplo, un cultivo de células animales (tal como cultivo de célula de mamífero). El biorreactor puede ser de cualquier tamaño mientras que sea útil para cultivo de células, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, el biorreactor será de por lo menos 30 ml y puede ser de 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, que incluye, pero no se limitan a pH y temperatura, se controlan típicamente durante el periodo de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto de cualquier material que sea adecuada para alojar cultivos de células de mamíferos suspendidos en medio bajo condiciones de cultivo de la presente invención, que incluyen vidrio, plástico metal. El término "biorreactor de producción" como se utiliza aquí se refiere al biorreactor final utilizado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen de un bioreactor de producción de cultivo celular a gran escala es generalmente mayor de aproximadamente 100 ml, típicamente por lo menos aproximadamente 10 litros, y puede ser de 500, 100, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros o más, o cualquier volumen intermedio.

Un experto en la técnica será capaz de seleccionar, biorreactores adecuados para uso en la práctica de la presente invención.

Los términos "densidad celular" "concentración celular", o
5 similares, como se utiliza aquí, se refieren a ese número, peso, masa, etc. de células presentes en un volumen de medio dado. "densidad celular pico" o similares se refiere al número máximo de células que se pueden alcanzar en un volumen de medio dado, y "densidad de célula pico deseada" o similar se refiere al número
10 máximo de células que un medico desea obtener (por ejemplo, objetivos) en un volumen celular dado. Variaciones de tales valores objetivo serán cercanos a aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, un experto puede expresar un valor objetivo en términos de masa celular deseada, y tales valores objetivos
15 pueden estar en una o más unidades de medición apropiadas (por ejemplo, unidades de masa celular pico deseadas).

El término "viabilidad celular" como se utiliza aquí se refiere a la capacidad de la células en el cultivo para sobrevivir bajo u
20 conjunto de condiciones de cultivo o variaciones experimentales dadas. El término como se utiliza aquí también se refiere a esa porción de la células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

25 Los términos "cultivos" y "cultivo celular" como se utilizan aquí se refieren a una población de células que está suspendida en un medio de cultivo celular bajo condiciones adecuadas para supervivencia y/o crecimiento de la población celular. Como se

utilizan aquí, estos términos se pueden referir a la combinación que comprende la población celular (por ejemplo, el cultivo de células de animal) y el medio en el que se suspende la población.

5 El término "densidad celular viable integrada" o "IVC" como se utiliza aquí se refiere a la densidad promedio de células viables durante el curso del cultivo multiplicado por la cantidad de tiempo que ha transcurrido de cultivo. Asumiendo que la cantidad de polipéptido y/o proteína producida es proporcional al número
10 de células viables presentes durante el curso del cultivo, la densidad celular viable integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o proteína producida durante el curso del cultivo.

15 Los términos "medio", "medio de cultivo celular", y "medio de cultivo" como se utiliza aquí se refieren a una solución que contiene nutrientes que alimentan al animal en crecimiento, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas,
20 fuentes de energía, lípidos, y oligoelementos requeridos por la célula para crecimiento mínimo y/o supervivencia. La solución también puede contener componentes que mejoren el crecimiento y/o supervivencia por encima del índice mínimo, que incluye hormonas y factores de crecimiento. La solución se formula preferiblemente
25 a un pH y concentración de sal optimas para la proliferación y supervivencia celular. En una modalidad, el medio es un medio definido. Los medios definidos son medios en los cuales todos los componentes tienen una estructura química conocida. En otra modalidad de la invención, el medio puede contener un aminoácido

derivado de cualquier fuente o método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, un aminoácido derivado de adición de aminoácidos sencillos o de peptona o adición de hidrolisato de proteína (que incluye adiciones de fuentes de plantas o animales).

El término "siembra" como se utiliza aquí se refiere al proceso de proporcionar un cultivo celular para un biorreactor u otro recipiente. Las células pueden haber sido propagadas previamente en otro biorreactor o recipiente. Alternativamente, las células pueden haber sido congeladas o descongeladas antes de, por ejemplo, inmediatamente antes de, suministrándolas al biorreactor o recipiente. El término se refiere a cualquier número de células, que incluyen una única célula.

El término "título" como se utiliza aquí se refiere a la cantidad total de polipéptido de interés producida por un cultivo de células de animal, dividido por una cantidad dada de volumen de medio; así "título" se refiere a una concentración. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido por mililitro de medio.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende por lo menos uno, y típicamente dos, dominios VH o sus porciones, y/o por lo menos uno, y típicamente dos, dominios VL o sus porciones. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulinas pesadas y dos cadenas de inmunoglobulinas livianas, en donde las cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana se interconecta por,

por ejemplo, enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o una porción de estos, se puede obtener a partir de cualquier origen, que incluye, pero no se limita a, roedores, primates (por ejemplo primate humano y no humano), camélidos etc., o ellos se pueden producir recombinantemente, por ejemplo métodos quiméricos, humanizados y/o generados in Vitro, por ejemplo, por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmentos de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste de un dominio VH; (vi) un dominio variable de cadena pesada de camélido o camelizado (VHH); (vii) un Fv monocatenario (scFv; ver adelante); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina fusionada a una región Fc. Adicionalmente, aunque los dos dominios de los fragmentos Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, ellos se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite ser hechos como una única cadena de proteína en la que los pares de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)); ver, por ejemplo, Bird et al (1988) Science 242:423-26; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83). Tales

anticuerpos monocatenarios también están destinados a ser abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos se pueden obtener utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan para función en la misma forma ya que son anticuerpos intactos.

El "fragmento de unión a antígeno" puede, opcionalmente, incluir adicionalmente un grupo funcional que mejora uno o más de, por ejemplo, estabilidad, función de célula efectuadora o fijación de complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede incluir adicionalmente un grupo funcional pegilado, albúmina, o una región constante de cadena liviana y/o pesada.

A diferencia de anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecíficos" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/liviana diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o ligado de los fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, Songsivilai and Iachmann (1990) Clin. Exp. Immunol 79:315-21; Kostelny et al. (1992). J. Immunol. 148:1547-53.

25

La frase "proteínas" o "producto de proteínas" se refiere a una o más cadenas de aminoácidos. Como se utiliza aquí, el término "proteínas" es sinónimo de "polipéptido" y, como se entiende de manera general en la técnica, se refiere a por lo menos una

cadena de aminoácidos ligados por vía de enlaces de péptidos
secuenciales. En ciertas modalidades, una "proteína de interés" o
un "polipéptido de interés" es una proteína codificada por una
molécula de ácido nucleico exógena que se ha transformado en una
5 célula anfitriona. En ciertas modalidades, en donde la "proteína
de interés" se codifica mediante un ADN exógeno con el que se ha
transformado la célula anfitrión, la secuencia de ácido nucleico
del ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. En ciertas
modalidades, una "proteína de interés" es una proteína codificada
10 por una molécula de ácido nucleico que es endógena a las células
anfitrionas. En ciertas modalidades, la expresión de tal una
proteína endógena de interés se altera al transfectar una célula
anfitriona con una molécula de ácido nucleico exógena que puede,
por ejemplo, contener una o más secuencias reguladoras y/o
15 codificar una proteína que mejora la expresión de la proteína de
interés. Los métodos y composiciones de la presente invención se
pueden utilizar para producir cualquier proteína de interés, que
incluye, pero no se limita a proteínas que tienen propiedades
farmacéuticas, de diagnóstico, agrícolas, y/o cualquiera de una
20 variedad de otras propiedades que son útiles en aplicaciones
comerciales, experimentales y/o otras aplicaciones.
Adicionalmente, una proteína de interés puede ser una proteína
terapéutica. A saber, una proteína terapéutica es una proteína
que tiene un efecto biológico sobre una región en el cuerpo sobre
25 el cual esta actúa o sobre una región del cuerpo sobre el cual
esta actúa remotamente por vía de intermedios. Ejemplos de
terapéuticos de proteína se discuten aquí en más detalle
adelante.

En ciertas modalidades, las proteínas producidas utilizando métodos y/o composiciones de la presente invención se pueden procesar y/o modificar. Por ejemplo, una proteína a ser producida de acuerdo con la presente invención se puede glicosilar.

5

La presente invención se puede utilizar con células de cultivo para la producción ventajosa de cualquier proteína terapéutica, tal como anticuerpos, receptores, enzimas relevantes comercialmente o farmacéuticamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales), proteínas de fusión Fc, citoquinas, hormonas, factores reguladores, factores de crecimiento, factores de coagulación/aglutinamiento, agentes de unión a antígeno, etc. un experto en la técnica reconocerá que se pueden producir otras proteínas de acuerdo con la presente invención, y será capaz de utilizar los métodos descritos aquí para producir tales proteínas.

Construcciones de Expresión y Generación de Células Anfitrionas Recombinantes

20

La presente invención utiliza células anfitrionas recombinantes, por ejemplo, células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, es decir, células transfectadas con una construcción de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de de interés. La frase "células de animal" abarcan invertebrados, vertebrados no mamíferos (por ejemplo, aves, reptiles y anfibios), y células de mamífero. Ejemplos no limitantes de células de invertebrados incluyen los siguientes células de insectos: *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti*

(mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori* (gusano de seda/polilla de seda)

5 Un número de estirpes de células de mamíferos son células anfitrionas adecuadas para expresión recombinante de polipéptido de interés. Las estirpes de células anfitrionas de mamíferos incluyen, por ejemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, 10 C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L células, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murino (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y C2C12 células, así como también estirpes de células de primates transformadas, hibridomas, células diproides normales y cepas de células 15 derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Cualquier célula eucariótica que sea capaz de expresar el polipéptido de interés se puede utilizar en los métodos de diseño de medios descritos. Numerosas estirpes celulares están disponibles de fuentes comerciales tal como el 20 American Type Culture Collection (ATCC). En una modalidad de la invención, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo de células a gran escala, emplea células hibridoma. La construcción de las células de hibridoma que producen anticuerpos se conoce bien en la técnica. En una modalidad de la invención, el cultivo 25 celular, por ejemplo, el cultivo de célula a gran escala, emplea células CHO.

Alternativamente, puede ser posible producir polipéptidos de interés en forma recombinante en eucariotes inferiores tal como

levadura, o en procariotes tal como bacterias. Cepas de levaduras adecuadas incluyen las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos de interés. Las
5 cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar el polipéptido de interés.

La expresión en las bacterias puede resultar en la
10 formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Así, el replegamiento de la proteína recombinante se puede requerir con el fin de producir material activo o más activo. Se conocen en la técnica diversos métodos para obtener proteínas heterólogas plegadas correctamente a partir de cuerpos
15 de inclusión bacterianos. Estos métodos involucran generalmente solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, luego desnaturalizar la proteína completamente utilizando un agente caotrópico. Cuando los residuos de cisterna están presentes en la secuencia de aminoácido primaria de la proteína, es
20 frecuentemente necesario lograr el replegamiento en un ambiente que permita la formación correcta de enlaces de disulfuro (un sistema redox). Los métodos generales para el replegamiento se describen en Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187-95, EP 0433225, y Patente Estadounidense No. 5,399,677.

La presente invención utiliza construcciones, en la forma de plásmidos, vectores, y casete de transcripción o expresión que comprenden por lo menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés. Los vectores son capaces de dirigir la

expresión de los genes a los que ellos se ligan de manera operable. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión recombinante" o "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar intercambiablemente cuando el plásmido está en la forma de vector más común. Sin embargo, la invención está destinada a incluir otras formas de vectores de expresión que sirven funciones equivalentes, que incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos (por ejemplo retrovirus de replicación defectuosa, alfavirus modificados, adenovirus y adenoasociados).

Las construcciones que son adecuadas para expresión de proteínas en células de animales se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden ligar operativamente a una secuencia de control de expresión tal como aquellas presentes en los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en, por ejemplo, Kaufman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485-90. otras secuencia de control de expresión adecuadas se encuentran en vectores conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: HaloTag™ pHT2, pACT, pBIND, pCAT®3, pCI, phRG, phRL (Promega, Madison, WI); pcDNA3.1, pcDNA3.1-E, pcDNA4/HisMAX, pcDNA4/HisMAX-E, pcDNA3.1/Hygro, pcDNA3.1/Zeo, pZeoSV2, pRc/CMV2, pBudCE4 pRc/RSV (Invitrogen, Carlsbad, CA); pCMV-3Tag Vectors, pCMV-Script® Vector, pCMV-Tag Vectors, pSG5 Vectors (Stratagene, La Jolla, CA); pDNR-Dual, pDNR-CMV (Clonetech, Palo Alto, CA); y pSMEDA (Wyeth, Madison, WI). Los métodos generales de expresión de proteínas recombinantes también se conocen y se

ejemplifican en, por ejemplo, Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:537-66.

Como se define aquí "ligado operablemente" significa ligado
5 enzimáticamente o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido a ser expresado y la secuencia de control de expresión en una forma que la proteína codificada se expresa por la célula anfitriona transfectada.

10 Las construcciones de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tal como secuencias reguladoras (por ejemplo, secuencias que regulan la replicación de vector (por ejemplo, orígenes de replicación, transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el
15 polipéptido (o péptido) de interés) o expresión de polipéptido codificado), las secuencia tag tal como histidina, y genes de marcador seleccionables. El término "secuencia reguladoras" está destinado a incluir promotores, mejoradores y cualquier otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de
20 poliadenilación, sitios de empalme de transcripción) que controlan la transcripción, replicación o traducción. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Aquellos expertos en la técnica
25 reconocerán que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, dependerá de varios factores, que incluyen la elección de la célula anfitriona y el nivel de expresión de proteína deseado. La secuencia reguladoras preferidas para expresión de proteínas en células anfitrionas de

mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína, tal como promotores y/o mejoradores derivados del promotor FF-1a y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, el promotor/mejorador CMV), virus de Simio 40 (SV40) (por ejemplo, el promotor/mejorador SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), y poliovirus. Los elementos reguladores víricos, y sus secuencias, se describen en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,168,062; 4,510,245; y 4,968,615, todas las cuales se incorporan como referencia aquí en su totalidad.

Los vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias mejoradoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado, ya sean seleccionadas o construidas. La expresión de proteínas inducibles, lograda al utilizar vectores consecuentes promotor inducibles, tal como vectores inducibles por tetraciclina- por ejemplo, pTet-On™ y pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA), también se pueden utilizar en el método descrito. Para detalles adicionales relacionados con los vectores de expresión, ver, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2nd ed.) eds. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989). Muchas técnicas conocidas y protocolos para manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagenia, secuenciamiento, introducción de ADN en células, expresión génica, y análisis de proteínas, también se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular*

Biology (2nd ed.) eds. Ausubel et al., Wiley & Sons, Alameda, CA (1992).

Un polinucleótido insertado en una construcción de
5 expresión para producir un polipéptido de interés puede
codificar cualquier polipéptido que sea capaz de ser expresado
en la célula anfitriona utilizada en el cultivo celular. Así, el
polinucleótido puede codificar productos de gen de longitud
completa, porciones de genes de longitud completa, péptidos, o
10 proteínas de fusión. Tales polinucleótidos pueden consistir de
ADN geonómico o cDNA, y se pueden derivar de cualquier animal.
Los polinucleótidos también se pueden aislar de células u
organismos mediante métodos bien conocidos en la técnica, por
ejemplo, PCR o RT-PCR, o se pueden producir por métodos de
15 síntesis química convencional conocidos. Tales polinucleótidos
químicamente sintéticos pueden poseer propiedades biológicas en
común con polinucleótidos naturales, y así se pueden emplear
como sustitutos para polinucleótidos naturales.

20 Los polinucleótidos también pueden ser producidos
recombinantemente al ligar operablemente el polinucleótido que
codifica el polipéptido de interés a las secuencias de control
adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, tal
como vectores baculovirus, y que emplean un sistema de expresión
25 de células de insectos. Materiales y métodos para los sistemas
de expresión baculovirus/Sf9 están disponibles comercialmente en
forma de equipo (por ejemplo, el equipo MAXBAC®, Invitrogen,
Carlsbad, CA).

La transfección de células anfitrionas, por ejemplo, células de animales, con la construcción de expresión se puede lograr mediante numerosos métodos que se conocen bien en la técnica. Las células se pueden transfectar transitoriamente o
5 transfectar establemente. Existen varios métodos diversos bien establecidos para el suministro de moléculas, particularmente ácidos nucleicos, en las células anfitrionas, por ejemplo, células de animal. Dependiendo del tipo celular, la transfección deseada (es decir, transitoria o estable), y los requerimientos
10 experimentales específicos, tal como transfección de estirpes celulares difíciles o células primarias, el tipo de molécula transfectada (ADN geonómico, ADN, oligonucleótidos), o la construcción de expresión seleccionada, cada método de transferencia posee ventaja y desventajas conocidas por aquellos
15 expertos en la técnica. Los métodos de transfección común incluyen, por ejemplo, precipitación por fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, transfección mediada por Dextrano DEAE, pistolas de genes, electroporación, suministro de nanopartículas, poliaminas, episomas, y polietileniminas.
20 Adicionalmente, los numerosos equipos de transfección y reactivos están disponibles comercialmente de compañías tales como Invitrogen (VOYAGER™, LIPOFECTIN®), EMD Biosciences, San Diego, CA (GENEJUICE™), Qiagen, Germantown, MD (SUPERFECT™), Orbigen, San Diego, CA (SAPPHIRE™), y muchos otros conocidos por
25 aquellos expertos en la técnica. Los protocolos de transfección también se pueden encontrar en *Basic Methods in Molecular Biology* (2nd ed.) eds. Davis et al., Appleton y Lange, CT (1994).

La presente invención utiliza cultivos celulares, por ejemplo, cultivos de células animales a gran escala, para producir grandes cantidades del polipéptido de interés. Los métodos para transfección transitoria a gran escala se describen

5 en *Large-scale Mammalian Cell Culture Technology* (Biotechnology y Bioprocessing Series) ed. Lubiniecki, Marcel Dekker, NY (1990); Kunaparaju et al. (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 91:670-77; Maiorella et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1406-10; Baldi et al., *supra*; Lan Pham et al., *supra*; Meissner et al., *supra*; Durocher

10 et al., *supra*). En general, la expresión de gen transitoria a gran escala en cultivos de células de mamíferos puede emplear uno cualquiera de diversos tipos comunes de modos de transfección, por ejemplo, polietilenimina, pulso de campo eléctrico, CALFECTION™ o fosfato de calcio, para lograr alta

15 eficiencia de transfección a volumen o escala deseada, por ejemplo, más de 10 litros (Derouazi et al., *supra*; Rols et al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206(1):115-21; Wurm y Bernard (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(2):156-59; Schlaeger y Christensen (1999) *Cytotechnology* 30(1-3):71-83; Jordan et al. (1998)

20 *Cytotechnology* 26(1):39-47; Lindell et al. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1676(2):155-61). Estos cultivos en gran escala se hacen crecer generalmente en biorreactores, agitadores o incubadoras con paletas de agitación, y también se conocen como "centrifugador" o cultivos de "suspensión". Así, opuesto a las

25 transfecciones tradicionales, en los que las células se adhieren a las placas o matraces, los métodos descritos utilizan generalmente cultivos en suspensión. Los cultivos de células a gran escala se consideran generalmente que son cultivos que tienen un volumen mayor de aproximadamente 100 ml.

En algunos casos, las estirpes celulares que expresan el polipéptido de interés se puede producir primero y luego utilizar para sembrar un cultivo celular a gran escala. Las
5 estirpes de células estables que expresan una proteína de interés se pueden producir por varios métodos bien conocidos, que incluyen los métodos utilizados para la transfección transitoria descrita aquí. En general, se producen estirpes de células estables mediante crecimiento a largo plazo y selección
10 en unos medios definido químicamente. Por ejemplo, las células transfectadas (por ejemplo, por precipitación de fosfato de calcio o transfección liposómica) con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés se pueden transfectar concomitantemente con un vector que lleva un gen de resistencia
15 a la neomicina, que confiere resistencia a la neomicina/geneticina (G418). Las células transfectadas se hacen crecer luego en medios que contiene G418, y las células sobrevivientes se expanden clonalmente para producir una estirpe de células que se expresan establemente. Luego se pueden
20 utilizar alícuotas de esta estirpe celular para sembrar un cultivo a gran escala y producir grandes cantidades de la proteína de interés.

La transfección de células requiere la optimización de
25 diversas variables, que incluyen densidad de siembra celular (por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 3×10^6 células/ml de cultivo), concentración de suero (por ejemplo, 0-10%), temperatura de incubación (por ejemplo, aproximadamente 20-38°C), reactivo o vehículo de transfección (químico o

eléctrico), volumen de cultivo (por ejemplo, aproximadamente 5 ml-20 litros), y tiempo de incubación (por ejemplo, aproximadamente 24-144 horas). Para cada tipo de célula, variará los parámetros óptimos. Sin embargo, los proveedores comerciales

5 suministran generalmente directrices de optimización para transfectar tipos de células particulares, como lo hacen varias referencias conocidas por aquellos expertos en la técnica que utilizan la transfección de las células anfitrionas seleccionadas. Estas fuentes se pueden utilizar para dirigir la

10 transfección de la célula anfitriona seleccionada, o se pueden utilizar como un punto de partida del cual el ensayo simple y error se puede utilizar para proporcionar parámetros de transfección óptimos.

15 Cultivo celular

Procedimientos típicos para producir un polipéptido de interés incluyen cultivos de tanda y cultivo de tanda-alimentación. Los procesos de cultivo de tandas comprenden

20 tradicionalmente inocular un cultivo de producción a gran escala con un cultivo de semillas de una densidad celular particular, hacer crecer las células bajo condiciones conductoras para crecimiento celular y viabilidad, cosechar el cultivo cuando la células alcanzan una densidad celular específica, y purificar el

25 polipéptido expresado. Los procedimientos de cultivo de tanda-alimentación incluyen una etapa adicional o etapas de complementación del cultivo de tanda con nutrientes y otros componentes que se consumen durante el crecimiento de las células. Una persona medianamente versada en la técnica

reconocerá que la presente invención se puede emplear en cualquier sistema en el que se cultivan células que incluyen, pero no se limitan a, tanda, tanda-alimentación y sistemas de perfusión. En ciertas modalidades preferidas de la presente
5 invención, se hacen crecer las células en sistemas de tanda-alimentación.

Un problema persistente y no resuelto con los cultivos tradicionales, por ejemplo, cultivos de tanda y tanda-
10 alimentación, es la producción de productos de desperdicio metabólicos, que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, viabilidad, y la producción de polipéptidos expresados. Dos productos de desperdicios metabólicos que tienen efectos particularmente perjudiciales son el lactato y amonio,
15 que se producen como un resultado del metabolismo de la glucosa y glutamina, respectivamente. Adicionalmente a la producción enzimática del amonio como un resultado del metabolismo de glutamina, el amonio también se acumula en cultivos celulares como un resultado de la degradación no metabólica durante el
20 tiempo.

Las formulaciones de medios tradicionales, que incluyen medios disponibles comercialmente tal como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio
25 de Tagle Modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma), contienen relativamente altos niveles de glucosa y glutamina (la última en comparación con otros aminoácidos). Previamente, se considera que estos componentes se requieren en abundancia debido a que ellos son fuentes de energía metabólica primaria para las

células. Sin embargo, el consumo rápido de estos nutrientes conduce a la acumulación de lactato y amonio como se describió anteriormente. Adicionalmente, los altos niveles de glucosa y glutamina iniciales, y la posterior acumulación de lactato y amonio, resultan en alta osmolaridad, una condición que por sí misma es frecuentemente perjudicial para el crecimiento celular, la viabilidad celular y la producción de polipéptidos. El medio diseñado racionalmente descrito aquí se puede modificar para reducir la acumulación de productos metabólicos perjudiciales. Tales modificaciones se pueden encontrar en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Publicadas Estadounidenses Nos. 2005/0070013 (alimentación de glucosa restringida) y 2006/0121568 (modificaciones de contenido de aminoácidos y relaciones) (ambos se incorporan aquí como referencia en su totalidad).

Formulaciones y Diseño de Medios Racional

Las formulaciones de medios tradicionales comienzan con un nivel relativamente bajo de aminoácidos totales en comparación con las formulaciones de medio de la presente invención. Por ejemplo, el DME-F12 (una mezcla 50:50 del medio de Eagle Modificado de Dulbecco y el medio F12 Ham) tiene un contenido total de aminoácidos de 7.29 mM, y el medio de cultivo celular tradicional conocido como RPMI-1640 tiene un contenido total de aminoácidos de 6.44 mM (ver por ejemplo, Morton (1970) *In Vitro* 6:89-108; Ham (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53:288-93; Moore et al. (1967) *J. Am. Medical Assn.* 199:519-24, todas incorporadas aquí como referencia). Las formulaciones de medio más (tal como el medio descrito en la solicitud de Patentes

Estadounidense Publicada No. 2006/0121568) contienen mayores niveles de aminoácidos y nutrientes. Las formulaciones tradicionales, sin embargo, no se basan en los requerimientos celulares calculados actuales, que incluyen crecimiento celular, mantenimiento celular y, para cultivos celulares utilizados para producir polipéptido recombinantes, requerimientos de producción. Utilizar estas variables, suministradas aquí con métodos para determinar las formulaciones de medios con concentraciones muchos mayores, y aún no tóxicas, de aminoácidos totales.

Las formulaciones de medios de cultivo celular, por ejemplo, las formulaciones de medios de cultivo celular a gran escala, descritas aquí, cuando se utilizan de acuerdo con, por ejemplo otras etapas de cultivos descritas aquí, y con, por ejemplo modificaciones tal como aquellas encontradas en, por ejemplo, la Solicitud de Patente Estadounidense Publicada No. 2006/0121568, optimizan la densidad celular y el título de polipéptido. Una concentración de aminoácido de las formulaciones de medios descritas aquí se basan en la concentración de aminoácidos requeridos para: 1) masa celular; 2) mantenimiento celular; y 3) producción de polipéptido. En una modalidad de la invención, un medio de cultivo celular contiene una concentración de los aminoácidos que se calcula para uso en masa celular, una concentración de los aminoácidos que se calcula para uso en el mantenimiento celular, y una concentración de los aminoácidos que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés. En otra modalidad de la invención, un medio de cultivo celular contiene una concentración, A, de un aminoácido que se representa

por la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es la concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es la concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es el multiplicador de la masa celular deseada (es decir, las unidades pico deseadas de masa celular), N es el multiplicador de la concentración deseada de polipéptido de interés (es decir, título de polipéptido deseado u objetivo), Y es el factor de mantenimiento celular; y F es el factor de valor inicial.

La concentración, P, del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad título de polipéptido en la fórmula anterior se basa en la estructura primaria de la proteína recombinante, es decir, el contenido de aminoácido del polipéptido. Así, P variará con base en el polipéptido de interés que se produce por el cultivo celular a gran escala. P puede luego ser convertido al requerimiento de aminoácido para la concentración objetivo de polipéptido de interés utilizando N, el multiplicador para la concentración deseada de polipéptido de interés (es decir, título de polipéptido objetivo o deseado). En algunos ejemplos representativos de la invención adelante, la unidad básica de título de polipéptido es 1 g/L. En la tabla 1, adelante, que contiene un cálculo representativo que utiliza la fórmula suministrada aquí, la concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se requiere para el polipéptido de interés en un título de 10 g/L (columna 4) se determina al multiplicar

la concentración, P, del aminoácido requerido para 1 g/L
(columna 2) por el multiplicador, N, en donde $N=10$.

Tabla 1: Determinación Representativa del Concentración de
5 Aminoácido Ajustado a Valores Iniciales Requerido para título
objetivo de 10 g/L de Anticuerpo en una Masa celular Deseada, En
donde la Masa celular Deseada se Representa por la densidad
celular de pico deseada de 15×10^6 células/ml

1	2 (P)	3 (X)	4 (P x N)	5 (X x M)	6 (X x M x Y)	7	8 (A) (Columna 7 x F)
Aminoácido (AA)	Concentración AA Requerida Para título de anticuerpo inicial de g/L	Concentración AA Requerida para masa celular representada por densidad celular de 10 ⁶ células/ml	Concentración AA total Requerida Para título de anticuerpo objetivo de 10 g/L (N=10)	Concentración Total AA Requerida para densidad celular pico deseada de 15 x 10 ⁶ células/ml (M=15)	Concentración Total AA Requerida para el mantenimiento celular (Y=100% (Y=1))	Concentración Total AA calculada a partir de título de anticuerpo objetivo y densidad celular de pico deseada	Concentración AA ajustada a valores iniciales requerida para título de anticuerpo objetivo y densidad celular de pico deseada (F=1.3)
			Columna 2 x 10	Columna 3 x 15	Columna 5 x 100%	(Columna 4+5+6)	Columna 7 x 1.3
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
ALA	0.41	0.30	4.08	4.56	4.56	13.20	17.17
ARG	0.17	0.16	1.73	2.38	2.38	6.50	8.45
ASN	0.26	0.15	2.62	2.23	2.23	7.08	9.21
ASP	0.29	0.29	2.87	4.36	4.36	11.59	15.07
CYS	0.19	0.09	1.88	1.42	1.42	4.73	6.14
GLU	0.40	0.16	4.00	2.33	2.33	8.67	11.26
GLN	0.39	0.29	3.87	4.40	4.40	12.67	16.47
GLY	0.47	0.25	4.72	3.80	3.80	12.33	16.02
HIS	0.16	0.07	1.59	1.07	1.07	3.72	4.83
ILE	0.14	0.16	1.43	2.33	2.33	6.10	7.93
LEU	0.49	0.25	4.88	3.80	3.80	12.49	16.24
LYS	0.52	0.24	5.20	3.55	3.55	12.31	16.00
MET	0.10	0.06	0.97	0.86	0.86	2.69	3.50
PHE	0.23	0.12	2.34	1.78	1.78	5.89	7.65
PRO	0.59	0.16	5.94	2.33	2.33	10.61	13.79
SER	0.97	0.34	9.73	5.11	5.11	19.96	25.94
THR	0.68	0.20	6.80	3.04	3.04	12.88	16.75
TRP	0.16	0.04	1.64	0.56	0.56	2.75	3.58
TYR	0.35	0.12	3.48	1.78	1.78	7.03	9.14
VAL	0.74	0.23	7.36	3.50	3.50	14.36	18.67
Total (mM)	7.71	3.68	77.13	55.21	55.21	187.55	243.82

El multiplicador N se puede calcular, por ejemplo, al multiplicar la densidad celular viable integrada (IVC) por la productividad específica (qp) de una estirpe celular particular (N=IVC*qp). Por ejemplo, si la densidad de semilla de una estirpe celular particular es 0.8×10^6 células/ml, la densidad celular en el día 6 y día 10 es 15×10^6 células/ml, y la densidad celular en el día 18 es 11×10^6 células/ml (es decir, 73% del valor en los días 6 y 15), entonces el IVC= 211×10^6 (células/ml)*día (es decir, $[(0.8+15)/2]*6$ días + $[(15+15)/2]*4$ días + $[(15+11)/2]*8$ días). Si la productividad específica promedio (qp) de la estirpe celular seleccionadas es, por ejemplo, $47 \mu\text{g}/10^6$ células/día, entonces N=10 g/L en el día 18 (es decir, 211×10^6 (células/ml)*día x $47 \mu\text{g}/10^6$ células/día). Un experto en la técnica reconocerá que estos cálculos se pueden desarrollar con cualquier estirpe celular, o que N se puede estimar basado en características celulares y de origen. Alternativamente, el multiplicador N no necesitará ser calculado del IVC y qp, y puede simplemente ser un título objetivo razonable para un cultivo celular particular. Un ejemplo profético, que describe el cálculo de IVC y qp, y la selección adicional de valores N y M razonables, se proporciona como el Ejemplo 5 (adelante).

Como se utiliza aquí, "masa celular," "densidad celular," y similares se refiere a una colección de células. Por ejemplo, una masa celular se puede referir a un glóbulo celular. Como se utiliza aquí, "masa celular deseada" y similares se refiere a

una colección de células, por ejemplo, un glóbulo celular, que un médico desea obtener en un cultivo celular. Como se utiliza aquí, "unidad de masa celular" y similares refleja un número de formas de representación de masa celular, por ejemplo, número de
5 células, densidad celular, volumen celular, volumen celular empacado, peso celular seco, etc. Para una condición experimental particular un experto en la técnica sabrá que la forma más conveniente o apropiada de representar una unidad de masa celular, etc. Un experto en la técnica también entenderá
10 que, dependiendo de la unidad de masa celular, M , el multiplicador para la masa celular deseada, es decir, las unidades pico deseadas de la masa celular, se representará por lo números de células pico deseadas, densidad celular de pico deseada, volumen celular pico deseado, volumen celular empacado
15 pico deseado, peso seco pico deseado, etc.

En una modalidad de la invención, la unidad de masa celular se representa por la densidad celular y la masa celular deseada se representa por la densidad celular de pico deseada. En otra
20 modalidad, la unidad de masa celular se representa por masa o pesos de células secas. La masa celular deshidratada consiste esencialmente de todas proteínas, carbohidratos, lípidos, y ácidos nucleicos presentes en esa masa celular. Así, la concentración, X , de un aminoácido se puede determinar
25 experimentalmente, al centrifugar primero un número conocido de células para un glóbulo celular, secar el glóbulo celular y posteriormente exponer el glóbulo celular a hidrólisis ácida, lisando por lo tanto las proteínas celulares del glóbulo celular para aminoácidos individuales, que luego se pueden cuantificar

por un analizador de aminoácidos (ver, por ejemplo, Ejemplo 1). Esto proporciona la concentración de aminoácido, X, de un número dado de células, que luego se puede convertir al requerimiento del aminoácido para la densidad celular pico deseada utilizando M, el multiplicador para la densidad celular pico deseada. En la tabla 1, la concentración de aminoácido total del medio de cultivo celular que se requiere para la densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml (columna 5) se determina al multiplicar la concentración, X, del aminoácido requerido para 10^6 células/ml (columna 3) por el multiplicador, M, en donde $M=15$. Así, en algunos ejemplos representativos de la invención, la unidad de masa celular es 10^6 células/ml. Alternativamente, por ejemplo, para un aminoácido conocido por ser susceptible a degradación, la concentración, X, del aminoácido que se utiliza en la fórmula anterior se puede determinar de los valores de la literatura, por ejemplo, Nyberg et al. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-35; Nadeau et al. (2000) *Metab. Eng.* 2:277-92; y Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318, o los métodos descritos en tales publicaciones o publicaciones similares conocidas en la técnica.

Cuando el multiplicador M para la masa celular deseada es la densidad celular pico deseada representada, M se puede seleccionar como, por ejemplo, la densidad pico de un estirpe celular particular, por la densidad en la cual la productividad de la estirpe celular se maximiza, o por la densidad predicha para la estirpe celular en un periodo de tiempo particular basado en el índice de crecimiento específico.

La concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se requiere para el mantenimiento celular, Y , es un porcentaje de la concentración de aminoácido requerida para la masa celular deseada, por ejemplo, la densidad celular pico deseada. En una

5 modalidad de la invención, el requerimiento de mantenimiento varía de 0% a 300% del requerimiento de masa celular deseado, que proporciona los nutrientes suficientes para uso celular sin riesgo de toxicidad inducida por nutrientes. En otra modalidad de la invención, el requerimiento de mantenimiento varía de 0% a

10 150% del requerimiento de masa celular deseado, que proporciona los nutrientes suficientes para uso celular sin riesgo de toxicidad inducida por nutrientes. El requerimiento de mantenimiento se incrementan cuando se incrementa la duración del cultivo (por ejemplo, 100-150% de mantenimiento para un cultivo

15 de 21 días). En la tabla 1, la concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se requiere para el mantenimiento celular (columna 6) se determina al multiplicar la concentración de aminoácido requerida para la densidad celular pico deseada (columna 5) por el factor de mantenimiento celular, Y , que en

20 este ejemplo representativo es 100%, con el fin de permitir un periodo de cultivo extendido. El factor de mantenimiento requerido, Y , diferirá para diferentes células (y diferentes estirpes celulares) dependiendo de las demandas metabólicas únicas de las células en el cultivo. Adicionalmente, los

25 requerimientos de mantenimiento para las células en el cultivo también diferirán debido a la variabilidad en los procesos, por ejemplo, densidad de inoculación, duración del cultivo, tiempo de cambio de temperatura, etc. Como una directriz inicial, uno puede proporcionar, por ejemplo, 0% de mantenimiento (diariamente) para

los cultivos en los días 0 a 5, 3% a 5% de mantenimiento (diariamente) para los cultivos en los días 6 a 10, y 7% a 10% de mantenimiento (diariamente) para los cultivos en los días 11 a 21. Para un proceso mayor de 21 días, se pueden proporcionar cultivos de 2% a 5% de mantenimiento (diariamente) para aquellos días adicionales. Una persona medianamente experta en la técnica reconocerá que ajustar el factor de mantenimiento, Y, para optimizar la densidad y el título, es únicamente un asunto de rutina de ensayo y error. Ajustar la concentración de aminoácido de acuerdo con el requerimiento de mantenimiento celular es importante para la viabilidad y productividad incrementada del cultivo celular, y así es un aspecto importante de la presente invención. Por ejemplo, ajustar la concentración de aminoácido de acuerdo con el requerimiento de mantenimiento celular permite al cultivo celular sostener mayor densidad celular, viabilidad celular, y producir título de polipéptido mayor (ver, por ejemplo, Ejemplo 6).

Una vez los requerimientos de aminoácidos: 1) masa celular (columna 5); 2) mantenimiento celular (columna 6); y 3) producción de polipéptidos deseados se determinan para el título objetivo (columna 4), se puede obtener la concentración de aminoácido total calculada para el cultivo celular objetivo. En la tabla 1, la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular que se requiere para el cultivo celular objetivo (columna 7), se determina al agregar la concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se requiere para el polipéptido de interés en un título de 10 g/L (columna 4), la concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se

requiere para la densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml (columna 5), y la concentración de aminoácido del medio de cultivo celular que se requiere para un nivel seleccionado de mantenimiento celular (columna 6).

5

Una vez se obtiene la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular que se requiere para el cultivo celular objetivo como se describió anteriormente, el valor se ajusta a una concentración de aminoácido del medio de cultivo celular deseado, A, por un factor de valor inicial, F, que permite controlar la fuerza de transferencia amino, por ejemplo, los aminoácidos extra requeridos para transferencia de masa, los aminoácidos extra requeridos para conducir el transporte a través de la membrana celular, etc. Este valor ajustado, A, se denomina aquí como la "concentración de aminoácido ajustada al valor inicial" o "concentración optimizada." La concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, representa la cantidad total acumulada de los aminoácidos que se suministrarán al cultivo, expresado con relación al volumen final del cultivo, que incluye el volumen del medio de partida, más el volumen de cualesquier alimentación para perfusión o cultivos de tanda-alimentación. Ajustar la concentración de aminoácido total a la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial es un aspecto importante de la invención debido a que este permite mayor viabilidad celular, densidad celular, y títulos de polipéptido (ver, por ejemplo, Ejemplo 6).

El factor de valor inicial, F, que incrementa la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular por hasta

200%, varía de 1 (0% de incremento) a 3 (200% de incremento). En una modalidad de la invención, el rango para F está entre 1 y 1.5. En otra modalidad de la invención, un valor de F por debajo de 1 puede estar desfasado al modificar la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular (**Tabla 1**, columna 7), que se puede alcanzar al modificar la concentración de aminoácido requerida para la masa celular deseada, la concentración de aminoácido requerida para el mantenimiento celular, y/o la concentración de aminoácido requerida para incorporación en el polipéptido de interés. Por ejemplo, un factor de valor inicial de 0.5 se puede desfasar al incrementar la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular mediante, por ejemplo, un factor de dos (o más), que se puede alcanzar al variar M, X, N, P y/o Y. En la tabla 1, la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, del medio de cultivo celular que se requiere para el título objetivo y la densidad celular pico deseada (columna 8), se determina al multiplicar la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular (columna 7), mediante el factor de valor inicial, F, que en el ejemplo representativo de la **Tabla 1** es 1.3 (correspondiente a un 30% de incremento sobre la concentración de aminoácido total calculada del medio de cultivo celular).

El medio que contiene la concentración ajustada al valor inicial, A, de un aminoácido se denomina aquí como el "medio de cultivo celular deseado." Así, el "medio de cultivo celular deseado" representa un medio objetivo que contiene la concentración ajustada al valor inicial, A. Este medio comprende por lo menos una concentración de aminoácido determinada por la fórmula

000145

anterior. Preferiblemente el medio de cultivo celular deseado contiene más de una concentración de aminoácido determinada por la fórmula anterior. Más preferiblemente, el medio de cultivo celular deseado contiene por lo menos doce concentraciones de aminoácido ajustadas, por ejemplo, una concentración ajustada de arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofan, tirosina, y valina, determinada por la fórmula anterior. Se entenderá por un experto en la técnica que la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, en el medio de cultivo celular deseado se puede alcanzar por cualquier número de medios, que incluye, pero no se limita a, agregar individualmente los aminoácidos, agregar peptona u otros hidrolisatos de proteína, y/o al agregar otro medio de cultivo celular concentrado (por ejemplo, un medio de alimentación de cultivo celular (o mezcla de medio, por ejemplo, un polvo de medio) para un medio de cultivo celular de partida (o mezcla del medio celular de partida, por ejemplo, un polvo de medio). Un experto en la técnica entenderá que la adición de peptona (u otro hidrolisato de proteína) se puede dirigir por los contenidos de aminoácidos del producto de elección peptona particular, o al determinar la concentración de aminoácido proporcionada por una peptona particular, por ejemplo, en general, 5 g/L de peptona proporciona una concentración de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM de aminoácidos totales.

La concentración de aminoácido en el medio de cultivo celular deseado se basa en por lo menos una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, determinada por la fórmula

inventiva descrita aquí; sin embargo, esa concentración, así como también otras concentraciones de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado, pueden variar de la concentración de aminoácido(s) ajustada al valor inicial debido a la influencia de

5 varios factores. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden producir durante el cultivo, y así se pueden mantener en un nivel bajo. Otros aminoácidos pueden variar con base en los valores publicados (ver, por ejemplo, la solicitud de patente publicada Estadounidense No. 2006/0121568). Adicionalmente, algunos

10 aminoácidos, por ejemplo, metionina, se pueden consumir en un índice mayor mediante tipos celulares particulares, y así se debe agregar en exceso. Todavía otros aminoácidos, tal como prolina, proporcionan una fuerza de impulsión para el crecimiento celular y la producción de polipéptido (ver Ejemplo 4), y estos

15 aminoácidos deben proporcionar, en algunos casos, en una cantidad mayor de la determinada por la fórmula inventiva anterior. En adición, uno puede modificar la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial si la concentración obtenida utilizando la fórmula anterior se considera que es tóxica (por ejemplo,

20 consideración de los niveles de serina, tirosina, metionina y valina). Esto está dentro del conocimiento de un experto en la técnica, luego de obtener la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de los aminoácidos para uso en el medio de cultivo celular deseado, para variar la concentración de

25 aminoácido ajustada al valor inicial con base en factores tales como aquellos anotados aquí.

Los componentes de medios adicionales, por ejemplo, vitaminas, sales, glucosa, elementos, se puede calcular a partir de (o con

base en) varias fuentes, por ejemplo, la solicitud de patente publicada Estadounidense Nos. 2005/0070013 y 2006/0121568. Adicionalmente, la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de un aminoácido obtenido utilizando la fórmula anterior se puede modificar para proporcionar un índice particular en relación con otro aminoácido (por ejemplo, el índice de glutamina a asparagina) o para caber dentro de una concentración combinada deseada (por ejemplo, la concentración combinada deseada de glutamina y asparagina). Por ejemplo, se sabe que una asparagina grande, medio de glutamina bajo, combinado con cambio de temperatura, permite la captación de lactato, desintoxicando por lo tanto un cultivo celular (la solicitud de patente publicada Estadounidense No. 2006/0121568). Así, uno desearía modificar la concentración ajustada al valor inicial, A, de glutamina y/o asparagina, con el fin de obtener un índice óptimo.

Se notará del ejemplo representativo en la tabla 1 que la concentración combinada deseada de las concentraciones de aminoácidos ajustada al valor inicial para uso en el medio de cultivo celular deseado es alto, es decir, más de 243 mM. Así, se describe aquí el hallazgo de una concentración alta de aminoácidos que se puede utilizar en un medio de cultivo celular deseado sin toxicidad o detrimento de título si la concentración se basa en los requerimientos de aminoácido calculados para una densidad celular objetivo y título de polipéptido. En una modalidad de la invención, la concentración combinada de los aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 250 mM. En otras

modalidades, la concentración combinada de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado es mayor de aproximadamente 250 mM, por ejemplo, aproximadamente 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 5 450, 460, 470, 480, 490, 500 o 510 mM, o cualquier valor intermedio.

La concentración ajustada al valor inicial identificada anteriormente, A, de un aminoácido que se utiliza en un medio de cultivo celular deseado, se puede utilizar en tanda, tanda-
10 alimentación, y cultivos de perfusión. Cuando se utiliza en el cultivo de tanda, la concentración inicial del aminoácido utilizada en el medio de cultivo celular deseado es la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A. Cuando
15 se utiliza en la tanda-alimentación o cultivos de perfusión, la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, representa la cantidad total acumulada de los aminoácidos que se suministrarán al cultivo, que incluye el volumen del medio de partida más el volumen de todas las alimentaciones. Así, para el
20 cultivo de tandas-alimentación, que utiliza alimentaciones continuas (por ejemplo, alimentación en los días 3-21) o alimentación periódica (por ejemplo, alimentación cada 2-3 días), el medio de partida se construye por ingeniería para contener una
concentración de partida del aminoácido, B, de acuerdo con la
25 fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, en donde Z es la concentración del aminoácido en el medio de alimentación de cultivo celular, y V es el volumen del medio de cultivo de alimentación como una proporción del volumen del medio de cultivo celular deseado. Un ejemplo representativo de los cálculos requeridos para obtener la

concentración de aminoácido de partida, B, se proporciona en la **tabla 2**, adelante. En la **tabla 2**, algunas concentraciones de aminoácidos ajustadas al valor inicial, A (columna 2), se convierten a la concentración de aminoácido de los medios de partida, B (columna 5), con base en 17% de volumen de alimentación (V=17%), y la concentración de aminoácido del medio de alimentación, Z (columna 4). En este ejemplo, varias concentraciones de aminoácido ajustadas al valor inicial, A (columna 2), y partiendo de las concentraciones de aminoácidos, B (columna 5), se modifican a los valores mostrados en negrilla en las columnas 3 y 6. La modificación de concentraciones de asparagina, ácido aspártico, glutamina, y cisteína se basa en las concentraciones sugeridas por la solicitud de patente publicada Estadounidense No. 2006/0121568; metionina se ajusta al 50% para compensar su consumo en una cantidad mayor que la predicha; alanina, ácido glutámico y glicina se producen por los cultivos (y así se mantienen en un nivel bajo); y concentraciones de serina, tirosina, y valina se reducen a niveles no tóxicos. Por lo tanto se entenderá que la concentración de aminoácido de partida, B, se puede basar en la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, o en la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial modificado.

Un experto en la técnica apreciará que el medio de alimentación utilizado para obtener el medio de cultivo celular deseado durante la tanda-alimentación y cultivo celular de perfusión deberá ser tan altamente concentrado como sea posible con el fin de evitar reflujo en el contenedor en el que se lleva a cabo el cultivo (por ejemplo, un biorreactor o matraz de agitación) y

para evitar dilución de los componentes de los medios. En el ejemplo establecido adelante en la **tabla 2**, medios de alimentación preferidos se denotan "medio de alimentación," y las concentraciones de aminoácidos, Z, del medio de alimentación se establecen en la columna 4. Sin embargo, cualquier medio de alimentación altamente concentrado, o puede utilizar cualquier método para proporcionar aminoácidos altamente concentrados al medio de cultivo celular de partida, mientras que la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial deseado, A, se alcanzará en un volumen objetivo. Tales métodos para proporcionar aminoácidos altamente concentrados al cultivo celular se utilizan comúnmente y son bien conocidos por un experto en la técnica.

Se entenderá por un experto en la técnica que la concentración de partida del aminoácido, B, en el medio de cultivo celular de partida se puede alcanzar por cualquier número de medios, que incluye, pero no se limita a, agregar individualmente los aminoácidos, agregar peptona y/o otro hidrolisato de proteína, y/o agregar otro medio de cultivo concentrado (o medio de mezcla, por ejemplo, un polvo de medio) al medio de cultivo celular de partida (o mezcla del medio de cultivo celular de partida, por ejemplo, un polvo de medio). También se entenderá por un experto en la técnica que la concentración del aminoácido, Z, en el medio de alimentación de cultivo celular se puede alcanzar por cualquier número de medios, que incluye, pero no se limita a, agregar individualmente los aminoácidos, agregar peptona y/o otro hidrolisato de proteína, y/o agregar otro medio de cultivo concentrado (o mezcla de medio, por ejemplo, un polvo de medio)

al medio de alimentación de cultivo celular (o mezcla del medio de alimentación de cultivo celular, por ejemplo, un polvo de medio).

5 Se notará del ejemplo representativo en la tabla 2 que la concentración combinada deseada de aminoácidos para uso en el medio de cultivo celular de partida es alto, es decir, más de 125 mM. Así, se describe aquí el hallazgo que una concentración alta de aminoácidos se puede utilizar sin toxicidad o detrimento del

10 título en un medio de cultivo celular de partida si la concentración de aminoácido de partida se basa luego del aminoácido calculado requerido para una densidad celular de pico deseada y un título de polipéptido deseado. En una modalidad de la invención, la concentración combinada deseada de aminoácidos

15 está entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 510 mM. En una modalidad de la invención, la concentración combinada deseada de aminoácidos está entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM. En otra modalidad de la invención, la concentración combinada deseada de aminoácidos en el medio de cultivo celular

20 de partida está entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 140 mM. En otra modalidad de la invención, la concentración combinada deseada de aminoácidos en el medio de cultivo celular de partida es mayor de aproximadamente 140 mM.

25 **Tabla 2:** Determinación Representativa de concentración de aminoácido de partida para un Título Objetivo del Anticuerpo 10 g/L, una densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml, y una alimentación de 17%

000152

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Aminoácido (AA)	concentración AA ajustada al valor inicial Requerida para título objetivo y densidad celular pico deseada	Modificación de la concentración AA ajustada al valor inicial Requerida para título objetivo y densidad celular pico deseada	concentración del medio de alimentación AA	concentración de partida AA Requerida para título objetivo y Densidad celular pico deseada (V=17%)	concentración de partida AA de modificación Requerido para título objetivo y densidad celular pico deseada
	mM	mM	mM	mM	mM
ALA	17.17	0.20	6.4	-1.07	0.2
ARG	8.45	8.45	35.13	2.99	2.99
ASN	9.21	24.00	56	17.45	17.45
ASP	15.07	1.70	16	-1.23	1.7
CYS	6.14	0.40	0	0.48	0.4
GLU	11.26	0.20	6.4	-1.07	0.2
GLN	16.47	4.00	0	4.82	4.2
GLY	16.02	4.00	6.4	3.51	3.51
HIS	4.83	4.83	11.2	3.53	3.53
ILE	7.93	7.93	28.82	3.65	3.65
LEU	16.24	16.24	41.53	11.06	11.06
LYS	16.00	16.00	32	12.72	12.72
MET	3.50	5.25	12.8	3.71	3.71
PHE	7.65	7.65	16	5.94	5.94
PRO	13.79	13.79	19.2	12.68	12.68
SER	25.94	25.94	48.15	21.39	10.2
THR	16.75	16.75	25.6	14.94	14.94
TRP	3.58	3.58	5.11	3.27	3.27
TYR	9.14	9.14	12.75	8.40	5.2
VAL	18.67	18.67	25.6	17.25	10.2
Total (mM)	243.82		405.09		127.73

Como se muestra en la **Tabla 3A y Tabla 3B**, la determinación de la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial de un aminoácido, A, utilizada en un medio de cultivo celular deseado, y la determinación de la concentración de aminoácido de partida, B, utilizada en el medio de cultivo celular de partida, se puede calcular para cualquier título objetivo deseado de polipéptido y densidad celular de pico deseada (objetivo). La densidad celular

pico deseada de cultivo a gran escala varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 40×10^6 células/mL para el cultivo de tándem-alimentación. En una modalidad de la invención, la densidad celular pico deseada varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20×10^6 células/mL. El título objetivo del cultivo a gran escala varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 25 g/L. En todavía otra modalidad de la invención, el título objetivo del cultivo a gran escala varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 g/L. Por ejemplo, en la tabla 3, la densidad celular pico deseada varía de 10 a 15×10^6 células/mL, y el título objetivo varía de 3 a 10 g/L.

Tabla 3A: Ejemplos Representativos de las concentraciones de aminoácidos ajustadas al valor inicial, A, para varios Títulos objetivo (Como se representa por un multiplicador para el título objetivo de polipéptido, N) y Densidades celulares pico deseadas (Como se representa por un multiplicador para la densidad celular pico deseada, M).

A	N=10 M= 15	N=5 M=12.5	N=3 M=10
concentración de aminoácido	mM	mM	mM
ALA	17.2	12.5	9.50
ARG	8.5	6.3	4.81
ASN	9.2	6.5	4.89
ASP	15.1	11.3	8.68
CYS	6.1	4.3	3.20
GLU	11.3	7.7	5.60
GLN	16.5	12.1	9.14
GLY	16.0	11.3	8.43
HIS	4.8	3.3	2.46
ILE	7.9	6.0	4.60
LEU	16.2	11.4	8.50
LYS	16.0	11.1	8.18
MET	3.5	2.5	1.87
PHE	7.7	5.4	3.99
PRO	13.8	8.9	6.36
SER	25.9	17.4	12.66
THR	16.8	11.0	7.93
TRP	3.6	2.3	1.61
TYR	9.1	6.1	4.43
VAL	18.7	12.4	8.94
Total	243.8	169.8	125.8

5

10

15 **Tabla 3B:** Ejemplos representativos de Concentraciones de
aminoácidos de medios de partida, B, para varios Títulos objetivo
(Como se representa por un multiplicador para el título objetivo
de polipéptido, N) y Densidades celulares de pico deseadas (Como
se representa por un multiplicador para la densidad celular pico
20 deseada, M); Concentraciones de aminoácidos de medios de partida
se determinan al restar la alimentación y otras modificaciones de
las concentraciones de aminoácidos ajustadas al valor inicial

B	N=10 M=15	N=5 M=12.5	N=3 M=10
concentración de aminoácido	mM	mM	mM
ALA	0.2	0.2	0.20
ARG	3.0	1.9	1.68
ASN	17.4	14.6	10.77
ASP	1.7	1.7	1.70
CYS	0.4	0.4	0.40
GLU	0.2	0.2	0.20
GLN	4.0	4.0	4.00
GLY	3.5	3.6	3.75
HIS	3.5	2.2	1.56
ILE	3.6	2.5	2.10
LEU	11.1	6.9	5.09
LYS	12.7	7.9	5.73
MET	3.7	2.4	1.78
PHE	5.9	3.8	2.75
PRO	12.7	7.4	5.04
SER	10.2	10.2	9.00
THR	14.9	8.8	6.10
TRP	3.3	1.8	1.24
TYR	5.2	5.1	3.58
VAL	10.2	10.4	7.22
Total	127.5	95.9	73.89

15 Utilizando la fórmula para determinar la concentración de
 aminoácido(s) ajustada al valor inicial y para desarrollar
 formulaciones de medio de cultivo celular deseado para la
 producción de polipéptido a gran escala, los inventores han
 identificado varios criterios que resultan en título mayor y
 20 cultivos de densidad celular mayores. Los criterios para producir
 un título mayor de 5 g/L, que se representan por los valores
 mostrados en la tabla 4, incluyen, pero no se limitan a, uno o
 más de los siguientes: mayor que o igual a aproximadamente 3 mM
 tirosina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM
 25 prolina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM
 valina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM
 leucina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM
 treonina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM
 lisina; una concentración combinada de leucina, lisina, prolina,

treonina y valina que está entre aproximadamente 35 mM y aproximadamente 150 mM; una concentración combinada de leucina, lisina, treonina y valina que está entre aproximadamente 60% a aproximadamente 80% de los aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular deseado; una concentración combinada de los aminoácidos esenciales en el medio de cultivo celular deseado que está entre aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de los aminoácidos totales en el medio de cultivo celular deseado; y/o una concentración combinada de aminoácidos totales entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 510 mM.

Tabla 4: Ejemplos representativos del contenido de aminoácido y Relaciones Para Medios Diseñados Racionalmente para varios Títulos objetivo y Densidades celulares de pico deseadas (como se anotó anteriormente, la unidad básica de título de polipéptido es 1 g/L, y la unidad básica de masa celular es 10^6 células/ml).

Aminoácido	N=5 M=10 Y=0 F=1 (mM)	N=10 M=10 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=10 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=20 Y=1 F=1.3 (mM)	N=15 M=30 Y=1.5 F=1.3 (mM)
ALA	5.08	13.21	15.86	23.77	37.62
ARG	2.46	6.39	7.51	11.65	18.88
ASN	2.80	7.28	8.98	12.85	19.62
ASP	4.34	11.29	13.15	20.71	33.94
CYS	1.89	4.91	6.14	8.60	12.91
GLU	3.55	9.24	11.84	15.89	22.96
GLN	4.87	12.66	15.18	22.80	36.15
GLY	4.90	12.73	15.79	22.39	33.93
HIS	1.50	3.91	4.94	6.78	10.01
ILE	2.27	5.91	6.84	10.88	17.96
LEU	4.98	12.94	16.12	22.71	34.25
LYS	4.97	12.92	16.30	22.46	33.23
MET	1.06	2.76	3.39	4.88	7.50
PHE	2.35	6.11	7.63	10.71	16.09
PRO	4.53	11.77	15.63	19.67	26.75
SER	8.27	21.51	27.83	36.70	52.21
THR	5.43	14.11	18.53	23.81	33.04
TRP	1.19	3.10	4.16	5.13	6.82
TYR	2.92	7.60	9.87	12.94	18.33
VAL	6.01	15.63	20.42	26.48	37.10
Concentración total	75.37	195.97	246.11	341.81	509.28
Esencia l total	32.22	83.78	105.84	145.49	214.87
Negrilla Total	21.39	55.61	71.37	95.46	137.61
Negrilla/Esencial	66%	66%	67%	66%	64%
Negrilla/Total	28%	28%	29%	28%	27%
Esencia l/Total	43%	43%	43%	43%	42%

En la tabla 4, los aminoácidos en negrilla son valina, treonina, leucina y lisina, los aminoácidos en cursiva son los aminoácidos esenciales (por ejemplo, arginina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, triptofan, treonina, y valina; y para cultivos celulares CHO, prolina es adicionalmente un aminoácido esencial; un experto en la técnica reconocerá variaciones en la definición de aminoácidos esenciales cuando este se aplica a diferentes células, etc.). La **Tabla 4**

proporciona los medios de cultivo celular deseado representativo para células CHO en una variedad de densidades celulares objetivo (M), títulos objetivo (N), mantenimiento celular requerido (Y), y ajustes de valor inicial (F).

5

Un experto en la técnica reconocerá que los medios diseñados racionalmente de la invención se pueden utilizar para producir un polipéptido de interés, o se pueden utilizar en cultivo celular que no se diseña para producción de polipéptido. De acuerdo con

10

lo anterior, medios diseñados racionalmente se pueden utilizar en los métodos descritos de cultivo celular, por ejemplo, para el crecimiento eficiente, replicación y/o mantenimiento de cultivos celulares, por ejemplo, cultivos celulares a gran escala, que no contienen células anfitrionas construidas por ingeniería para

15

producir un polipéptido exógeno de interés, o que no se cultivan para producir un polipéptido endógeno de interés. En tal un caso, el medio de cultivo celular deseado no cuenta para los aminoácidos requeridos para incorporación en el polipéptido de interés, y en cambio contiene una concentración de aminoácidos

20

con base en la concentración de los aminoácido requeridos para: 1) masa celular deseada, y 2) mantenimiento celular. Tal un medio de cultivo celular deseado utilizado en los métodos descritos de cultivo celular contiene una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A' , de acuerdo con la fórmula

25

$A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, M es un multiplicador para una masa celular pico deseada (por ejemplo, densidad celular pico deseada, etc.) del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor

inicial. Un medio de cultivo celular deseado producido de acuerdo con esta fórmula luego se proporciona a un cultivo celular bajo condiciones que permiten crecimiento y replicación de las células en el cultivo celular. En una modalidad de la invención, el método de cultivo celular utiliza un cultivo celular a gran escala. En otra modalidad de la invención, el método de cultivo celular utiliza células de animales.

Adición de prolina a los medios de cultivo celular

10

Utilizando los métodos de diseño de medios racionales descritos aquí, se han determinado que mantener altos niveles de prolina a través del periodo de cultivo del cultivo celular, por ejemplo, cultivo celular a gran escala, resulta en título de polipéptido incrementado y densidad celular incrementada. Este "umbral" prolina varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM, y un nivel de prolina en el cultivo celular mantenido por encima este umbral parece ser una fuerza de impulsión para producir alta densidad celular, cultivos celulares de título alto a gran escala. De forma interesante, el título de polipéptido incrementa la impulsión de prolina y la viabilidad celular concomitantemente incrementa los requerimientos de cultivo para aminoácidos adicionales (con el fin de satisfacer el índice de consumo incrementado), que por lo menos explica parcialmente porqué las formulaciones de medios diseñados racionalmente aquí contienen altas concentraciones de aminoácidos.

20

25

Proporcionar un cultivo celular

Se conocen bien en la técnica varios métodos para preparar células de mamífero para la producción de polipéptidos en tanga y el cultivo de tanga-alimentación. Como se describió anteriormente, un ácido nucleico suficiente para alcanzar la expresión (típicamente un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés y cualesquier elementos de control genéticos ligados operablemente) se pueden introducir en la estirpe celular anfitriona mediante cualquier número de técnicas bien conocidas. Típicamente, se detectan células para determinar cuáles de las células anfitrionas han tomado actualmente el vector y expresan el polipéptido o proteína de interés. Métodos tradicionales para detectar un polipéptido particular o proteína de interés expresada por células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopia de inmunofluorescencia, SDS-PAGE, Western blots, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), técnicas de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. Una persona medianamente experta en la técnica reconocerá de otras técnicas apropiadas para detectar polipéptidos o proteínas expresadas. Si múltiples células anfitrionas expresan el polipéptido o proteína de interés, algunas o todas las técnicas mencionadas se pueden utilizar para determinar cuáles de las células expresan el polipéptido o proteína en niveles más altos.

Una vez una célula que expresa el polipéptido o proteína de interés se ha identificado, la célula se propaga en el cultivo por cualquiera de la variedad de métodos bien conocidos por una

persona medianamente experta en la técnica. La célula que expresa el polipéptido o proteína de interés típicamente se propaga al hacerla crecer en una temperatura y en un medio que conduce a la supervivencia, crecimiento y viabilidad de la célula. El cultivo inicial puede ser de cualquier volumen, pero es frecuentemente de volumen menor que el volumen del cultivo del biorreactor de producción utilizado en la producción final del polipéptido o proteína de interés, y frecuentemente las células se pasan varias veces en biorreactores de volumen incrementado antes de sembrar en el biorreactor de producción. El cultivo celular se puede batir o agitar para incrementar la oxigenación del medio y la dispersión de los nutrientes a las células. Alternativamente o adicionalmente, dispositivos de burbujeo especial que se conocen bien en la técnica se pueden utilizar para incrementar y controlar la oxigenación del cultivo. De acuerdo con la presente invención, una persona medianamente experta en la técnica entenderá que esto puede ser benéfico para controlar o regular ciertas condiciones internas de un cultivo celular, que incluye pero no se limita a pH (por ejemplo, 6.6 a 7.6), temperatura (por ejemplo, 25°C a 42°C), niveles de oxígeno y dióxido de carbono (por ejemplo, O₂: 10% a 80% y CO₂: 7% a 15%, a través del cultivo), y osmolalidad (por ejemplo, una osmolalidad de partida de 260 a 340 mOsm/kg), etc.

Como se utiliza aquí, el término "inoculo" se utiliza para referirse a un volumen de células que contienen el ácido nucleico que expresa el polipéptido de interés, que se utiliza para sembrar el recipiente de producción en el cual ocurrirá el cultivo animal a gran escala, por ejemplo, el biorreactor de

producción. En una modalidad de la invención, el volumen de inóculo es aproximadamente 60 a 80% del volumen final.

La densidad celular de partida en el biorreactor de producción se puede seleccionar por una persona medianamente experta en la técnica. De acuerdo con la presente invención, la densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan bajo como un volumen único de cultivo por célula. En modalidades preferidas de la presente invención, las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden variar de aproximadamente 0.1×10^6 células viables por mL a aproximadamente 10×10^6 células viables por mL y más.

Los cultivos celulares intermedios e iniciales se pueden hacer crecer a cualquier densidad deseada antes de sembrar el siguiente intermedio o biorreactor de producción final. En una modalidad de la invención, la densidad celular de inóculo es aproximadamente $0.5-1 \times 10^6$ células/mL. Se prefiere que la mayoría de las células permanezcan vivas antes de siembra, aunque no se requiera viabilidad total o casi total. En una modalidad de la presente invención, las células se pueden remover del sobrenadante, por ejemplo, por centrifugación a baja velocidad. También es deseable lavar las células removidas con un medio antes de sembrar el siguiente biorreactor para remover cualesquier productos de desperdicio metabólicos no deseados o los componentes de medio. El medio puede ser el medio en el cual las células se hacen crecer previamente o este puede ser un medio diferente o una solución de lavado seleccionada por el médico de la presente invención.

Las células luego se pueden diluir con una densidad apropiada para sembrar el biorreactor de producción. Las células se pueden diluir en otro medio o solución, por ejemplo, el medio de cultivo celular de partida o el medio de cultivo celular deseado, dependiendo de las necesidades y deseos del médico de la presente invención o para acomodar los requerimientos particulares de las mismas células (por ejemplo, si las células se almacenan durante un periodo corto de tiempo para sembrar el biorreactor de producción).

Fase de crecimiento inicial

Una vez el recipiente de producción se siembra como se describió anteriormente, el cultivo celular animal se puede mantener en la fase de crecimiento inicial utilizando el medio de cultivo celular deseado obtenido por la fórmula inventiva descrita aquí, y bajo condiciones que conducen a la supervivencia, crecimiento y viabilidad del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo celular, el organismo del cual la célula se deriva, y la naturaleza y carácter del polipéptido o proteína expresada.

Un biorreactor de producción puede ser cualquier volumen que sea apropiado para la producción a gran escala de polipéptidos o proteínas. En una modalidad preferida, el volumen del biorreactor de producción es por lo menos 500 litros. En otras modalidades preferidas, el volumen del biorreactor de producción es 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000 litros o más, o cualquier

volumen intermedio. Una persona medianamente experta en la técnica reconocerá que, y será capaz de seleccionar, un birreactor adecuado para uso en la práctica de la presente invención. El biorreactor de producción se puede construir de
5 cualquier material que es conductor para crecimiento celular y viabilidad que no interfiere con la expresión o estabilidad del polipéptido o proteína producida.

La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento
10 inicial se seleccionará principalmente con base en el rango de temperaturas en las cuales el cultivo celular permanece viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, buen crecimiento de células CHO a 37°C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien dentro de un rango de
15 aproximadamente 35°C a 39°C. En una modalidad de la invención, la temperatura para la fase de crecimiento (día 0 a día 3) es 37°C, y la temperatura para la fase de producción (después del día 3) es 31°C. Aquellas personas medianamente expertas en la técnica
serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas
20 apropiadas en las cuales crecen las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requerimientos de producción del médico.

En una modalidad de la presente invención, la temperatura de la
25 fase de crecimiento inicial se mantiene en una temperatura constante, única. En otra modalidad, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene dentro de un rango de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede incrementar constantemente o reducir durante la fase de crecimiento inicial.

Alternativamente, la temperatura se puede incrementar o reducir mediante cantidades discretas en varios tiempos durante la fase de crecimiento inicial. Una persona medianamente experta en la técnica será capaz de determinar si se deben utilizar
5 temperaturas únicas o múltiples, y si la temperatura se debe ajustar constantemente o mediante cantidades discretas.

Las células se pueden hacer crecer durante la fase de crecimiento inicial para una cantidad mayor o menor de tiempo, dependiendo de
10 las necesidades del médico y los requerimientos de las mismas células. En una modalidad, las células se hacen crecer durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular viable que es un porcentaje dado de la densidad celular viable máxima que las células podrían eventualmente alcanzar si se le
15 permite crecer ininterrumpidamente. Por ejemplo, las células se pueden hacer crecer durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular viable deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99
por ciento o más de la densidad celular viable máxima.

20

En otra modalidad las células se les permiten crecer durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de partida del cultivo celular, la temperatura en la cual las células se hacen crecer, y el índice de crecimiento
25 intrínseco de las células, las células se pueden hacer crecer durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, las células se les puede permitir crecer durante un mes o más. Las células se podrían hacer crecer durante 0 días en el biorreactor de

producción si su crecimiento en un biorreactor de siembra, en la temperatura de fase de crecimiento inicial, es suficiente que la densidad celular viable en el biorreactor de producción al momento de su inoculación ya está en el porcentaje deseado de la densidad celular viable máxima. El método de la presente invención será capaz de seleccionar la duración de la fase de crecimiento inicial dependiendo de la producción de polipéptido o proteína requerida y las necesidades de las mismas células.

10 El cultivo celular se puede batir o agitar durante la fase de cultivo inicial con el fin de incrementar la oxigenación y dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, una persona medianamente experta en la técnica entenderá que esto puede ser benéfico para controlar o

15 regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, que incluye pero no se limita a pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar al suministrar una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación se puede controlar con dispositivos de burbujeo

20 que se conocen bien en la técnica.

Condiciones de cambio de cultivo

Al final de la fase de crecimiento inicial, una condición de cultivo puede cambiar dado que se aplica un segundo conjunto de condiciones de cultivo y un cambio metabólico ocurre en el cultivo. La acumulación de los metabolitos inhibidores, más notablemente lactato y amoníaco, inhibe el crecimiento. Un cambio metabólico, acompañado por, por ejemplo, un cambio en la

temperatura, pH, osmolalidad o nivel de inductancia química del cultivo celular, se puede caracterizar por, por ejemplo, una reducción en la relación de un índice de producción de lactato específico a un índice de consumo de glucosa específico. En una

5 modalidad no limitante, las condiciones de cultivo cambian al cambiar la temperatura del cultivo. En otra modalidad de la invención, el cambio de temperatura ocurre en el día 1-7. En otra modalidad de la invención, la temperatura cambia a 29°C - 32°C. En otra modalidad de la invención, el cambio de temperatura

10 ocurre en el día 3, y la temperatura cambia a 31°C. Las enseñanzas con respecto al cambio de temperatura se pueden encontrar en la técnica (ver, por ejemplo, la solicitud de patente publicada Estadounidense No. US 2006/0121568).

15 Fase de producción posterior

Una vez las condiciones del cultivo celular han sido cambiadas como se discutió anteriormente, el cultivo celular se puede mantener durante una fase de producción posterior bajo un segundo

20 conjunto de condiciones de cultivo que conducen a la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y que es apropiado para la expresión del polipéptido deseado o proteína adecuada, por ejemplo, niveles comercialmente adecuados.

25 Como se discutió anteriormente, el cultivo puede cambiar al cambiar uno o más de un número de condiciones de cultivo que incluye, pero no se limita a, temperatura, pH, osmolalidad, y niveles de butirato de sodio. En una modalidad, la temperatura del cultivo cambia. De acuerdo con esta modalidad, durante la

fase de producción posterior, el cultivo se mantiene en una temperatura o rango de temperatura que es menor de la temperatura o rango de temperatura de la fase de crecimiento inicial. Por ejemplo, durante la fase de producción posterior, Células CHO que expresan bien polipéptidos y proteínas recombinantes dentro de un rango de 25°C a 35°C. En una modalidad de la invención, la fase de producción empieza después del día 3. En otra modalidad de la invención, la fase de producción se lleva a cabo a 31°C. Como se discutió en la solicitud de patente publicada Estadounidense No. US 2006/0121568, múltiples cambios de temperatura discreta se pueden emplear para incrementar la densidad celular o viabilidad o para incrementar la expresión del polipéptido recombinante o proteína.

De acuerdo con la fórmula de la presente invención, una masa celular deseada (por ejemplo, densidad celular) y título de producción (por ejemplo, el título objetivo) se seleccionan con el fin de establecer la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, y la concentración de aminoácido de partida, B. Así, generalmente las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que la densidad celular deseada o título de producción, o se alcance un valor cercano a la densidad celular deseada o título de producción. En una modalidad, las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que el título del polipéptido recombinante o proteína alcance un máximo. En otras modalidades, el cultivo se puede cosechar antes de este punto, dependiendo de la producción requerida del médico o las necesidades o viabilidad de las mismas células. Por ejemplo, las células se puede mantener durante un periodo de

tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular viable de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento o más de la densidad celular viable máxima. En algunos casos, puede ser deseable permitir a la densidad celular viable alcanzar un máximo, y luego permitir a la densidad celular viable declinar en algún nivel antes de cosecha del cultivo. En un ejemplo extremo, puede ser deseable permitir a la densidad celular viable obtener o alcanzar cero antes de cosecha del cultivo.

En otra modalidad de la presente invención, las células se les permiten crecer durante un periodo de tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, dependiendo de la concentración del cultivo celular en el inicio de la fase de crecimiento posterior, la temperatura en la cual las células se hacen crecer, y el índice de crecimiento intrínseco de las células, las células se pueden hacer crecer durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, las células se les puede permitir crecer durante un mes o más. El médico de la presente invención será capaz de seleccionar la duración de la fase de producción posterior dependiendo de la producción de polipéptido o proteína requerida y las necesidades de las mismas células. La duración del cultivo ayudará a determinar la concentración de aminoácido requerida para el mantenimiento celular, que puede variar en la presente invención de, por ejemplo, 0% a 150% de la concentración de aminoácido requerida para la masa celular.

En ciertos casos, puede ser benéfico o necesario para

complementar el cultivo celular, es decir, el cultivo celular de alimentación, durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que se han agotado o metabolizado por las células. Por ejemplo, puede ser ventajoso

5 complementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes de medio observados por haber sido agotados durante monitoreo del cultivo celular (ver la sección "Monitoreo de las Condiciones de Cultivo Celular", adelante). Alternativamente o adicionalmente, puede ser benéfico o necesario complementar el

10 cultivo celular antes de la fase de producción posterior. Como ejemplos no limitante, puede ser benéfico o necesario complementar el cultivo celular con hormonas y/o otros factores de crecimiento, particular iones (tal como sodio, cloro, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores, vitaminas, nucleósidos o

15 nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), lípidos, aminoácidos, o glucosa (u otra fuente de energía).

Se pueden agregar todos estos componentes complementarios, es

20 decir, alimento, al cultivo celular de una sola vez, o ellos se pueden proporcionar al cultivo celular en una serie de adiciones. En una modalidad de la presente invención, se proporcionan los componentes complementarios al cultivo celular en múltiples veces en cantidades proporcionales. En otra modalidad, puede ser

25 deseable proporcionar solo ciertos componentes complementarios inicialmente, y proporcionar los componentes restantes en un momento posterior. En todavía otra modalidad de la presente invención, el cultivo celular se alimenta continuamente con estos componentes complementarios.

De acuerdo con la presente invención, el volumen total agregado al cultivo celular debe óptimamente mantener una cantidad mínima. Por ejemplo, el volumen total del medio de alimentación, o
5 solución que contiene los componentes complementarios, agregado al cultivo celular puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% del volumen del cultivo celular antes de proporcionar los componentes complementarios. Así, el medio de alimentación se debe concentrar con el fin de evitar el
10 reflujo del biorreactor o la dilución del componente del medio. El medio de alimentación se proporciona preferiblemente al cultivo principal con el mismo pH, temperatura, etc., pero con altas concentraciones de nutrientes con relación al medio de partida. En una modalidad de la invención, el medio de
15 alimentación es el medio de alimentación diseñado "Medio de Alimentación" en la columna 4 de la **Tabla 2**.

En una modalidad de la invención, un cultivo celular con una concentración de aminoácido de partida, B, se complementa con un
20 aminoácido adicional con el fin de alcanzar una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A. En otra modalidad de la invención, el cultivo celular se proporciona con una alimentación continua de aproximadamente 3-21 días, o alimentaciones periódicas cada 2-3 días. En otra modalidad de la invención, la
25 alimentación ocurre de aproximadamente día 3 a aproximadamente día 20 (durante un cultivo de 21 días) como alimentaciones de bolo. En otra modalidad de la invención, la alimentación ocurre como alimentaciones periódicas aproximadamente cada 2-3 días. En todavía otra modalidad de la invención, el volumen de

alimentación es aproximadamente 1% a aproximadamente 40% del volumen de cultivo celular total.

El cultivo celular se puede batir o agitar durante la fase de
5 producción posterior con el fin de incrementar la oxigenación y
dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la
presente invención, una persona medianamente experta en la
técnica entenderá que esto puede ser benéfico para controlar o
regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la
10 fase de crecimiento posterior, que incluye pero no se limita a
pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede
controlar al suministrar una cantidad apropiada de ácido o base,
y la oxigenación se puede controlar con dispositivos de burbujeo
que se conocen bien en la técnica.

15 Monitoreo de Condiciones de cultivo celular

En ciertas modalidades de la presente invención, el médico puede
encontrar benéfico o necesario monitorear periódicamente
20 condiciones particulares del crecimiento del cultivo celular.
Monitorear las condiciones de cultivo celular permite al médico
determinar si el cultivo celular produce el polipéptido
recombinante de interés en niveles subóptimos o si el cultivo
entra aproximadamente en una fase de producción subóptima. Con el
25 fin de monitorear ciertas condiciones de cultivo celulares, puede
ser necesario remover alícuotas pequeñas del cultivo para
análisis. Una persona medianamente experta en la técnica
entenderá que tal remoción puede introducir potencialmente la
contaminación en el cultivo celular, y tendrá cuidado apropiado

para minimizar el riesgo de tal contaminación.

Como ejemplos no limitantes, puede ser benéfico o necesario monitorear la temperatura, pH, densidad celular, viabilidad
5 celular, densidad celular viable integrada, niveles de lactato, niveles de amoniaco, osmolaridad, o título del polipéptido expresado. Numerosas técnicas se conocen bien en el arte que permitirán a una persona medianamente experta en la técnica medir estas condiciones. Por ejemplo, la densidad celular se puede
10 medir utilizando un hemacitómetro, un contador Coulter, o examen de densidad celular (CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). La densidad celular viable se puede determinar al teñir una muestra del cultivo con azul Trypan. Ya que solo las células muertas colocadas en azul Trypan (es decir, células viables excluido el
15 tinte), la densidad celular viable se puede determinar al contar el número total de células, dividir el número de células que se colocan en el tinte por el número total de células, y colocar el recíproco. El HPLC se puede utilizar para determinar los niveles de lactato, amonio o el polipéptido expresado o proteína.
20 Alternativamente, el nivel de polipéptido expresado o la proteína se puede determinar por técnicas de biología molecular estándar tal como teñido Coomassie de geles SDS-PAGE, Western blotting, ensayos Bradford, ensayos Lowry, ensayos biuret, y absorbancia UV. También puede ser benéfico o necesario monitorear las
25 modificaciones post-traduccionales del polipéptido o proteína expresada, que incluye fosforilación y glucosilación.

Cosecha de Polipéptidos Producidos por el cultivo celular

El polipéptido de interés que se produce por el cultivo celular luego se puede purificar del medio de cultivo o de los extractos celulares para uso en varias aplicaciones. Las formas solubles del polipéptido se pueden purificar de los medios condicionados.

- 5 Las formas de unión de membrana del polipéptido se pueden purificar al preparar una fracción de membrana total de la célula que expresa y extrae las membranas con un detergente no iónico tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Las proteínas nucleares o sistólicas se pueden preparar al lisar las
- 10 células anfitrionas (por vía de fuerza mecánica, Parr-bomb, sonicación, detergente, etc.), remover la fracción de membrana celular mediante centrifugación, y retener el sobrenadante.

- El polipéptido se puede purificar utilizando otros métodos
- 15 conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido producido por los métodos descritos se puede concentrar utilizando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA).
- 20 Siguiendo la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. Alternativamente, puede emplear una resina de intercambio de anión (por ejemplo, una columna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); tal resina contiene una matriz o
- 25 sustrato que tiene grupos pendiente dietilaminoetilo (DEAE) o polietilenimina (PEI). Las matrices utilizadas para purificación pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en purificación de proteína. Alternativamente, una etapa de intercambio de catión se puede

utilizar para la purificación de las proteínas. Los intercambiadores de catión adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo (por ejemplo, columnas S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

La purificación del polipéptido del sobrenadante de cultivo también puede incluir una o más columnas etapas sobre resinas de afinidad, tal como A-agarosa concanavalina, AF-HEPARIN650, heparin-TOYOPEARL® o azul Cibacron 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); columnas de cromatografía de interacción hidrófoba utilizando tales resinas como éter fenilo, éter butilo, o éter propilo; o columnas de inmunoafinidad utilizando anticuerpos para la proteína marcada. Finalmente, una o más etapas de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) emplean medios HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo pendiente u otros grupos alifáticos (por ejemplo, columnas Ni-NTA), se pueden emplear para purificar adicionalmente la proteína. Alternativamente, los polipéptidos se pueden expresar recombinantemente en una forma que facilita la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden expresar como una fusión con proteínas tal como proteína de unión a maltosa (MBP), glutatióna-S-transferasa (GST), o tioredoxina (TRX). Los paquetes para la expresión y purificación de proteínas de fusión están disponibles comercialmente de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), y Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. Las proteínas también se pueden marcar con un epítipo pequeño (por ejemplo, etiquetas His, myc o Flag) y posteriormente identificar o purificar utilizando un

anticuerpo específico para el epítipo seleccionado. Anticuerpos para epítopos comunes están disponibles de numerosas fuentes comerciales.

- 5 Como una alternativa para modos de purificación de cromatografía tradicionales (por ejemplo, modos de purificación de cromatografía de eluato-unión o flujo pasante), los polipéptidos producidos por los métodos de la presente invención se pueden purificar al operar una columna de purificación de cromatografía
- 10 en un modo de partición débil, una técnica en la cual por lo menos un producto contenido en la preparación, y por lo menos un contaminante o impureza, se unen a una resina cromatográfica o medio. En el modo de partición débil, la por lo menos una impureza une más herméticamente al medio que el producto de
- 15 polipéptido; y como carga continua (fluido de carga), el producto de polipéptido no unido pasa selectivamente a través del medio y se recupera de la columna efluente. Tales resultados de purificación en un alto grado de reducción de impurezas, así como también alta recuperación del producto. Tal purificación se puede
- 20 lograr en medios y resinas conocidas en la técnica, que incluye pero no se limita a, medio de intercambio de ión cargado, resina cromatográfica de interacción hidrófoba, resinas de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada, y resina hidroxapatita. En por lo menos una modalidad, la remoción de impureza/contaminante
- 25 bajo condiciones de partición débil ocurre cuando el fluido de carga pasa a través del medio/resina que une por lo menos 2.8 mg del producto por ml de medio/resina. En por lo menos una otra modalidad, la remoción de impureza/contaminante bajo condiciones de partición débil ocurre cuando el fluido de carga pasa a través

del medio/resina en condiciones operantes definidas por un coeficiente de partición de por lo menos 0.1. El producto purificado se recupera del efluente de la columna que contiene el medio/resina.

5

La **Tabla 5** resume las diferencias en las características entre los modos flujo pasante (FT), eluato de unión (B-E), y particionamiento débil (WP).

000178

Tabla 5: Características de los modos FT/WP/B-E			
	FT	WP	B-E
Kp	< 0.1	0.1-20	>20
Limitación de prueba de carga	Impurezas 10-50 mg Prod/mL (típico) pero actualmente dependiente de la pureza de carga	Impurezas 50-500 mg Prod/mL (típico) pero actualmente dependiente de la pureza de carga	Producto + impurezas < 100 mg Prod/mL
Vol. De carga	Moderado, para impurezas diluidas 10-20 CVs	Muy alto, para impurezas diluidas hasta 50 CVs	bajo, como el producto que se une en adición a las impurezas 5-20 CVs
[Producto] en eluato de carga	Igual a la concentración de carga a través de mucha más carga	Etiqueta inicial, luego igual a la concentración de carga a través de mucha más carga	<5% de la concentración de carga
Residual [Impureza]	Bajo	Muy bajo	Dependiente de las condiciones de elusión, volumen y capacidad de grupo
Unión de Producto (Q)	< 1 mg/mL	< 10 - 20 mg/mL	> 10 - 20 mg/mL
Región Operante	Rango relativamente amplio de condiciones	Ventana modesta de operación entre los modos FT y B-E	Condiciones de unión astringentes para carga, amplio rango de condiciones de elusión
Fase móvil	Isocrático	Isocrático	cambio en la composición de amortiguador después que la carga origina elusión

El coeficiente de partición (Kp) es el índice de la concentración del producto adsorbido (Q) en la concentración del producto en la solución (C); así el Kp para el modo de particionamiento débil es intermedio entre el Kp para los modos de eluato de unión y flujo pasante, por ejemplo, entre aproximadamente 0.1 y 20. Con el fin de determinar las condiciones propias, por ejemplo, sal,

amortiguador, pH, etc., para un modo de particionamiento débil de purificación, una detección de alto rendimiento o se puede desarrollar un estudio de detección de purificación en tanda. Así, un experto en la técnica puede determinar los coeficientes de partición de producto K_p como una función de condiciones operantes (ver Ejemplo 7.1).

Los métodos de purificación utilizando un modo de particionamiento débil se describen en detalle en la Solicitud de Patente Estadounidense Nos. 11/372,054 y 11/510,634, las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores en varias combinaciones o con otros métodos conocidos, para purificar un polipéptido de interés producido por métodos de cultivo celular animal a gran escala y medios descritos aquí.

Composiciones farmacéuticas que contienen Polipéptidos Producidos por Cultivo Celular

20

Los medios de cultivo celular anteriores, por ejemplo, medios de cultivo celular a gran escala, y métodos para cultivar células que proporcionan polipéptidos de interés, por ejemplo, anticuerpos, receptores solubles, proteínas de fusión, etc. Los polipéptidos producidos por los métodos de cultivo celular descritos, y con los medios novedosos y métodos relacionados descritos aquí, que incluye anticuerpos y sus fragmentos, se puede utilizar *in vitro*, *ex vivo*, o incorporar en composiciones farmacéuticas y administrar a los individuos (por ejemplo,

sujetos humanos) en necesidad de estas. Varias investigaciones farmacogenómicas para considerar el determinar si administrar un polipéptido de la invención son bien conocidas por un experto en la técnica e incluyen asociación del tipo genoma, investigación del gen candidato, y el perfil de expresión de gen. Una composición farmacéutica de la invención se formula por ser compatible con su ruta pretendida de administración (por ejemplo, composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible). Otros ejemplos no limitantes de rutas de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las composiciones farmacéuticas compatibles con cada ruta destinada se conocen bien en la técnica.

Un polipéptido de la invención se puede utilizar como una composición farmacéutica cuando se combina con un portador farmacéuticamente aceptable. Tal una composición puede contener, en adición a un polipéptido de la invención, portadores, varios diluyentes, rellenos, sales, amortiguadores, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos). Las características del portador dependerán de la ruta de administración.

La composición farmacéutica de la invención también puede contener factores terapéuticos adicionales o agentes para el tratamiento del trastorno objetivo particular. Por ejemplo, una

composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes tipo 2 también puede incluir un agente antidiabético oral. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o antitrombóticos tal como activador de plasminógeno y Factor VIII.

- 5 La composición farmacéutica puede contener adicionalmente agentes antiinflamatorios. Tales factores adicionales y/o agentes se pueden incluir en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con un polipéptido de la invención, o para minimizar efectos colaterales originados por los polipéptidos de
- 10 la invención.

- La composición farmacéutica de la invención puede estar en la forma de una liposoma en los cuales un polipéptido de la invención se combina, en adición a otros portadores
- 15 farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tal como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposómica incluyen sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos,
- 20 sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, etc.

- Como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo
- 25 De la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, por ejemplo, alivio de los síntomas de, curación de, o incremento en el índice de curación de tales afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, se administra solo, el término se

refiere al ingrediente activo solo. Cuando se aplica en una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, si se administra en combinación, serialmente o simultáneamente.

5

En la práctica el método de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la invención se administra a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un humano). Un polipéptido de

10 la invención se puede administrar de acuerdo con el método de la invención solo o en combinación con otras terapias. Cuando se coadministra con uno o más agentes, un polipéptido de la invención se puede administrar simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el
15 especialista que atiende decidirá la secuencia apropiada para administrar los polipéptidos de la invención en combinación con otros agentes.

20 Cuando una cantidad terapéuticamente afectiva de un polipéptido de la invención se administra oralmente, el agente de unión estará en la forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en la forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un portador sólido tal como una gelatina o un
25 adyuvante. El comprimido, cápsula, y polvo contienen de aproximadamente 5 a 95% del agente de unión, y preferiblemente de aproximadamente 25 a 90% del agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, tal como aceite de

maní (ejerciendo precaución en relación con alergias al maní),
aceite mineral, aceite de soya, o se pueden agregar aceite de
sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición
farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina
5 fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tal
como etilenglicol, propilenglicol, o polietilenglicol. Cuando se
administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene
de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 90% en peso del agente
de unión, y preferiblemente de aproximadamente 1% a
10 aproximadamente 50% en peso del agente de unión.

Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido
de la invención se administra mediante inyección intravenosa,
cutánea o subcutánea, el polipéptido de la invención estará en la
15 forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de
pirógeno. La preparación de tales soluciones de proteína
parenteralmente aceptables, que se tiene con respecto a pH,
isotonicidad, estabilidad, y similares, está dentro de aquellos
expertos en la técnica. Una composición farmacéutica preferida
20 para inyección intravenosa, cutánea, o subcutánea debe contener,
en adición al polipéptido de la invención, un vehículo isotónico
tal como inyección de cloruro de sodio, inyección Ringer,
inyección de dextrosa, inyección de cloruro de dextrosa y sodio,
inyección de Ringer lactada, u otro vehículo como se conoce en la
25 técnica. La composición farmacéutica de la presente invención
también puede contener estabilizantes, conservantes,
amortiguadores, antioxidantes, o cualquier otro aditivo conocido
por aquellos expertos en la técnica.

La cantidad de un polipéptido de la invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y severidad de la afección a ser tratada, y de la naturaleza de tratamientos anteriores que el paciente ha experimentado.

5 Últimamente, el especialista que atiende decidirá la cantidad de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención con el cual se trata cada paciente individual. Inicialmente, el especialista que atiende administrará bajas dosis de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención y observa
10 la respuesta del paciente. Dosis mayores de una composición farmacéuticamente o polipéptido de la invención se puede administrar hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y que punto de dosificación no se incrementa generalmente adicionalmente. Se contempla que varias
15 composiciones farmacéuticas utilizadas para tratar un sujeto en necesidad de este puede contener aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 100 mg de un polipéptido de la invención por kg de peso corporal.

20 La duración de la terapia intravenosa (i.v.) utilizando una composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la severidad de la enfermedad a ser tratada y la afección y respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de
25 una composición farmacéutica o un polipéptido de la presente invención puede estar dentro del rango de, por ejemplo, 1-12, 6-18, o 12-24 hrs de administración i.v. continua o intermitente. También se contempla la terapia subcutánea (s.c.) utilizando una composición farmacéutica de la presente invención. Estas terapias

invención puede estar dentro del rango de, por ejemplo, 1-12, 6-18, o 12-24 hrs de administración i.v. continua o intermitente. También se contempla la terapia subcutánea (s.c.) utilizando una composición farmacéutica de la presente invención. Estas
5 terapias se pueden administrar diariamente, semanalmente, o, más preferiblemente, bisemanalmente, o mensualmente. Últimamente el especialista que atiende decidirá la duración apropiada de terapia i.v. o s.c., o la terapia con una molécula pequeña, y el tiempo de administración de la terapia, utilizando la
10 composición farmacéutica de la presente invención.

Todas las referencias, patentes, Solicitudes de patente, y publicaciones citadas en esta aplicación se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Los Ejemplos que siguen se establecen para ayudar al entendimiento de la invención pero no están destinados a, y no se deben construir para, limitar el alcance de la invención en cualquier forma. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales, tal como técnicas de ADN recombinante. Tales métodos son bien conocidos por aquellos medianamente expertos en la técnica.

10

Ejemplo 1

Cuantificación de la Composición de Aminoácido de Células CHO

15 Para cuantificar la composición de aminoácido de las células CHO que expresan anticuerpo y células CHO que expresan proteína recombinante, es decir, el porcentaje molar de cada aminoácido relacionado con el aminoácido total de masa celular (biomasa), se desarrolla el siguiente procedimiento. Brevemente, tres
20 anticuerpos que sobreexpresan estirpes celulares CHO o proteína recombinante, más específicamente anticuerpo anti-IL-22 (anticuerpo anti-IL-22 humano recombinante), anticuerpo Myo-029 (anticuerpo monoclonal IgG1 anti-GDF8), y BMP-2 humano recombinante, se hacen crecer en un matraz de agitación durante
25 uno (BMP-2) o tres (Myo-029 y anti-IL-22) días. En el día final, se cosechan los cultivos y las células se centrifugan a una concentración de 10^6 células/mL. Un sedimento que contiene 10^6 células se lava dos veces con 1 X PBS y el sedimento se resuspende en 500 μ L de HCl 5 N. La suspensión que contiene

célula se calienta a 100° C durante 24 horas, en cuyo punto se centrifuga la suspensión en vacío. El sedimento resultante se resuspende en 500 µL de PBS, y se desarrolla análisis de aminoácido utilizando cromatografía líquida o de gas.

5

La hidrólisis de ácido determina que metionina y triptofano se degradan durante la hidrólisis de ácido; así, las concentraciones de estos aminoácidos en los Ejemplos 2 y 3 se basan en los valores de la literatura para células CHO. Adicionalmente, se

10 determina que glutamina y asparagina se convierten a sus formas
acídicas, ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente,
durante hidrólisis; así, las concentraciones para estos cuatro
aminoácidos en los Ejemplos 2 y 3 se ajustan con base en las
relaciones glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico
15 reportadas en la literatura. De otra manera, se determina que
aquellas estirpes celulares CHO poseen composiciones de ácido
similar, y valores reportados cercanamente coincidentes para
otras células de mamíferos (datos no mostrados) (ver Bonarius
(1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318).

20

Ejemplo 2

Densidad Celular Pico Deseada de 15×10^6 células/ml, y Título de
Anticuerpo Anti-IL-22 Objetivo de 9 g/L en células CHO (Estirpe
25 celular 1) con 32% de Volumen de Alimentación Utilizando Medio

Diseñado Racionalmente

Ejemplo 2.1: Medio Diseñado Racionalmente

Utilizando la fórmula descrita aquí, se determina la concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de aminoácidos requeridos para 15×10^6 células/ml que producen 9 g/L de anticuerpo anti-IL-22 en Estirpe Celular CHO 1 (**Tabla 6**,
5 column 2) (el mantenimiento celular se establece en 50%, es decir, $Y=0.5$). La concentración de aminoácido se ajusta al valor inicial, A (**Tabla 6**, column 2), de una variedad de aminoácidos se ajustan para obtener las concentraciones de aminoácidos ajustadas al valor inicial modificado se muestran en la columna 3
10 de la **Tabla 6**. Se hacen los siguientes ajustes: se establecen los niveles de Asn, Asp, y Gln de acuerdo con la Solicitud de Patente Publicada U.S. No. US2006/0121568A1; 2) debido a que se producen Ala, Glu, Gly mediante los cultivos celulares, sus niveles se ajustan a valores inferiores; 3) el nivel de Cys se ajusta debido
15 al hecho de que la cisteína se utiliza también en el medio de alimentación, y el valor medio de cisteína se establece a aquel en la Solicitud de Patente Publicada U.S. No. US2006/0121568A1; 4) los niveles de Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe son 20% a 100% más altos que la concentración de aminoácido ajustada al
20 valor inicial, A, debido al hecho que el polvo de alimentación, que contiene una composición de aminoácido establecida, se utiliza para hacer el medio de cultivo celular deseado, de tal manera que una coincidencia exacta no es posible. Se calcula la concentración de aminoácido de medio de partida, B (**Tabla 6**,
25 column 4), a partir de las concentraciones de aminoácidos ajustadas con el valor inicial modificado mostradas en la columna 3 de la **Tabla 6**.

Tabla 6: Formulación de Medio de Cultivo Celular Deseado

Aminoácido	Concentración de Aminoácido Ajustada al Valor Inicial (mM) (A)	Concentración de Aminoácido Ajustada al Valor Inicial Modificada (mM)	Concentración de Aminoácido de Partida (mM) (B)
ALA	13.67	2.18	0.20
ARG	6.68	12.56	1.94
ASN	7.42	27.82	14.56
ASP	11.86	6.28	1.70
CYS	4.97	0.27	0.40
GLU	9.23	2.18	0.20
GLN	13.11	2.72	4.00
GLY	12.94	4.52	3.63
HIS	3.93	5.05	2.15
ILE	6.23	10.95	2.54
LEU	13.13	17.96	6.87
LYS	13.01	15.62	7.91
MET	2.82	5.71	2.38
PHE	6.19	7.67	3.76
PRO	11.50	11.15	7.36
SER	21.35	22.34	10.20
THR	13.89	14.18	8.80
TRP	3.00	2.89	1.84
TYR	7.53	7.55	5.10
VAL	15.44	15.24	10.36
Total	197.91	194.85	95.91

Ejemplo 2.2: Densidad Celular y Título de Anticuerpo en Respuesta a Medio diseñado racionalmente

Células de estirpe celular 1 (células CHO que expresan anti-IL-22) se obtienen a partir de matraces de agitación que contienen cultivos de 3 días, y se inoculan en 0.7 x 10⁶ células/ml en el día 0 dentro del medio de cultivo celular de partida en un

bioreactor de 1 L (Applikon 2L, (Applikon Inc, Foster City, CA)). En el día 3 (aproximadamente 80 horas), se cambia la temperatura de 37° C a 31° C y se agrega Medio de alimentación (ver columna 4 de la **Tabla 2**) en 3.75%, 4%, 4%, 9%, 2%, 1%, 1%, 1%, 3%, 2% y 1% en volumen en los días 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20, respectivamente, para obtener el medio de cultivo celular deseado, que contiene la concentración de aminoácido mostrada en la **Tabla 6**, columna 3. Se mantienen los cultivos celulares en pH 7.0, en un nivel de oxígeno disuelto de 30%, y con agitación a 200 rpm. Se toman las muestras diarias para probar densidad celular (instrumento de conteo celular CEDEX ® (Innovatis, Malvern, PA)), viabilidad (CEDEX ®) y ciertos niveles de metabolito (Nova BioProfile Analyzer, Nova Biomedical Cooperation, Waltham, MA). Se guardan medios hilados a -80° C durante análisis de título de anticuerpo utilizando Proteína A HPLC.

Se muestran los resultados en las **Figuras 1 y 2**. Como se puede ver a partir de la **Figura 1**, se alcanza la mayor densidad celular (aproximadamente 11×10^6 células/mL) en el día 11 del cultivo, con densidad celular que disminuye después. Se obtiene el mayor título de anticuerpo (aproximadamente 7 g/L) en el día 21 del cultivo. Así, el medio diseñado racionalmente se puede utilizar para producir mayor densidad celular y mayor título de anticuerpo.

Ejemplo 3

Densidad Celular Pico Deseada de 15×10^6 células/ml, y Título de Anticuerpo Anti-IL-22 Objetivo de 10 g/L en células CHO (Estirpe Celular 2) con 33% de Volumen de Alimentación Utilizando Medio

Diseñado Racionalmente

Ejemplo 3.1: Medio Diseñado Racionalmente

Utilizando la fórmula descrita aquí, se determina la
5 concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de
aminoácidos requeridos para 15×10^6 células/ml y 10 g/L
anticuerpo anti-IL-22 (descrito anteriormente) (el mantenimiento
celular se establece en 50%, es decir, $Y=0.5$). La concentración
de aminoácido ajustada al valor inicial, A (**Tabla 7**, columna 2)
10 de una variedad de aminoácidos se ajusta como se describe en el
Ejemplo 2 para obtener las concentraciones de aminoácidos
ajustadas con el valor inicial modificado se muestran en la
columna 3 de la **Tabla 7**. Adicionalmente, para esta formulación de
medio el medio de cultivo celular de partida y el medio de
15 alimentación se preparan a partir de polvos existentes con
composiciones fijas, y así una coincidencia exacta no es posible.
La concentración de aminoácido de medio de partida, B (**Tabla 7**,
columna 4), se calcula a partir de las concentraciones de
aminoácidos ajustadas con el valor inicial modificado que se
20 muestran en la columna 3 de la **Tabla 7**.

Tabla 7: Formulación de medio de cultivo celular deseado

Aminoácido	Concentración de aminoácido ajustada al valor inicial (mM) (A)	Concentración de aminoácido ajustada al valor inicial modificada (mM)	Concentración de aminoácido de partida (mM) (B)
ALA	14.2	2.4	0.4
ARG	6.9	15.2	5.3
ASN	7.8	32.6	21.1
ASP	12.2	6.8	2.3
CYS	5.2	0.3	0.4
GLU	9.7	2.4	0.4
GLN	13.6	2.7	4.0
GLY	13.6	4.5	3.6
HIS	4.1	5.5	2.7
ILE	6.4	13.2	5.4
LEU	13.8	20.0	9.4
LYS	13.7	16.5	8.9
MET	2.9	6.3	3.1
PHE	6.5	8.3	4.5
PRO	12.3	12.5	9.1
SER	22.6	23.8	11.8
THR	14.8	15.7	10.8
TRP	3.2	3.2	2.3
TYR	8.0	7.6	5.1
VAL	16.4	15.4	10.3
Total	207.93	214.8	121.1

Ejemplo 3.2: Densidad Celular y Título de Anticuerpo en Respuesta a Medio Diseñado Racionalmente

2 Células de Estirpe celular (células CHO que expresan anti-IL-22) se obtienen a partir de matraces de agitación que contienen cultivos de 3 días, y las células se inoculan en 0.7×10^6 células/ml en el día 0 dentro del medio de cultivo celular de partida en un biorreactor de 1 L (Applikon 2L). En el día 3

(aproximadamente 80 horas), se cambia la temperatura de 37° C a 31° C y se agrega alimentación continua (1.8% en volumen por día) con una bomba de alimentación automática, para obtener el medio de cultivo celular deseado, que contiene la concentración de aminoácido mostrada en la **Tabla 7**, columna 3. Se mantienen los cultivos celulares en pH 7.0, en un nivel de oxígeno disuelto de 30%, y con agitación a 200 rpm. Se toman las muestras diariamente para probar densidad celular (instrumento de conteo celular CEDEX ®), viabilidad (CEDEX ®) y ciertos niveles de metabolito (Nova Enzymatic analyzer). Se guardan medios hilados a -80° C durante análisis de título de anticuerpo utilizando Proteína A HPLC.

Se muestran los resultados en **Figuras 3 y 4**. Como se puede ver a partir de **Figura 3**, la mayor densidad celular (sobre 12×10^6 células/mL) se alcanza en el día 10 del cultivo, con densidad celular disminuyendo después. El mayor título de anticuerpo (sobre 10 g/L) se obtiene en el día 19 del cultivo. Así, el medio diseñado racionalmente se puede utilizar para producir mayor densidad celular y mayor título de anticuerpo.

Ejemplo 4

El Efecto de Adición de Prolina en Desempeño de Cultivo Celular

Las células CHO que producen al anticuerpo Anti-IL-22 se cultivan en matraces de agitación controlados por pH (matraces de 500 mL con 100 mL de volumen de trabajo), y se mantienen en un agitador a ~100 rpm en una temperatura controlada, 7% de incubador CO₂. Se siembran células en 0.7×10^6 células/mL. La duración de cultivo es 18 días. Los primeros 3 días se mantienen células a 37° C,

después de lo que la temperatura se cambia a 31° C durante el resto del cultivo. Se controla el pH durante los primeros 3 días con bicarbonato de sodio 1 M. El medio de cultivo celular consiste de un medio basado en requerimientos de cultivo celular tradicionales, llamado "Medio Tradicional," y medio diseñado racionalmente, es decir, medio formulado utilizando el diseño racional descrito aquí, llamado "Medio de Diseño Racional," para alcanzar 10×10^6 células/mL y 10 g/L de anticuerpo. Se nota una principal diferencia entre estas dos formulaciones es que varios aminoácidos (PRO, THR, GLY, TYR, TRP, VAL, y PHE) están en altas concentraciones en el "Medio de Diseño Racional" comparado con el "Medio Tradicional." Una tercera condición presentada es el medio tradicional con 3.7 mM adicionales de prolina agregados para obtener el nivel de prolina en el "Medio de Diseño Racional", llamado "Medio Tradicional + Prolina." Estas formulaciones se presentan en la **Tabla 8**, adelante. Se agrega medio de alimentación doméstico Wyeth ("Medio de Alimentación," ver la **Tabla 2**) al cultivo en 23% total en volumen, que comprende alimentaciones diarias de 2% en los días 3-4, 9-14, 17, 1% en los días 5-6, y 3% en el día 7.

Tabla 8: Formulaciones de Medios para Estudios de Prolina

- 000195

1	2	3	4
Aminoácido	Medio tradicional [mM]	Medio de diseño racional [mM]	Medio tradicional +Prolina [mM]
alanina	0.44	0.44	0.44
arginina•HCl	5.32	5.32	5.32
asparagina•H ₂ O	21.08	21.08	21.08
ácido aspártico	2.25	2.25	2.25
glutamina	4.00	4.00	4.00
glutamato	0.24	0.24	0.24
glicina	1.78	3.59	1.78
histidina	2.68	2.68	2.68
isoleucina	5.44	5.44	5.44
Leucina	9.43	9.43	9.43
lisina•HCl	8.90	8.90	8.90
metionina	3.08	3.08	3.08
fenilalanina	3.67	4.48	3.67
prolina	5.41	9.13	9.13
serina	11.82	11.82	11.82
treonina	5.71	10.85	5.71
Triptófano	1.54	2.32	1.54
tirosina•2Na	3.34	5.13	3.34
valina	7.36	10.30	7.36

Los resultados de estos experimentos se muestran en las **Figuras 5-7**. La adición de prolina al medio tradicional, es decir "Medio Tradicional + Prolina" (**Figura 5**), resulta en una producción de anticuerpo equivalente al "Medio de Diseño Racional" a lo largo del día 14. Como se muestra en la **Figura 6**, todos los tres medios se mantienen a mayor densidad celular, con la densidad más alta presentada en el día 12. Como se muestra en la **Figura 7**, todos los tres medios mantienen alta viabilidad celular, con los cultivos de "Medio de Diseño Racional" que mantienen mayor

viabilidad en los días 15-18 en comparación con los cultivos que contienen medios "Medio Tradicional" y "Medio tradicional + Prolina". Como una variedad de otros medios, en la que cada una contiene una concentración diseñada racionalmente de cualquier glicina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina o valina no resulta en cultivos celulares que producen un mayor título de anticuerpo que el "Medio Tradicional" (datos no mostrados), la prolina sirve como el aminoácido que limita la velocidad requerida para alcanzar mayor título. Esto se ejemplifica en las **Figuras 8A-E**, que muestran que en el día 14 muchos de los aminoácidos en el "Medio Tradicional + Prolina" alcanzan niveles extremadamente bajos (note que se agota la tirosina), evitando por lo tanto incorporación adicional de estos aminoácidos en el anticuerpo. También se observa este resultado en la gráfica de título (**Figura 5**), cuando se reduce la pendiente para el "Medio Tradicional + Prolina" después del día 14, mientras que la producción de anticuerpo se mantiene a lo largo del día 18 para el "Medio de diseño racional," que contiene mayores niveles de otros aminoácidos.

De forma interesante, la concentración de prolina en el "Medio Tradicional" nunca cae por debajo de 1 mM (**Figura 8A**); sin embargo, se reduce el efecto de prolina en la incorporación de aminoácido completa en el anticuerpo después del día 11. Este hallazgo sugiere que existe un umbral de prolina, es decir, la concentración de prolina se debe mantener por encima de 1 mM a través del cultivo.

Ejemplo Profético: Medios de Cultivo Celular Optimizado para una
Estirpe Celular Novedosa

Los métodos de diseño de medios descritos aquí se pueden utilizar
5 para cualquier cultivo celular, que incluyen cultivos celulares
que utilizan células novedosas/estirpes celulares. Los medios
optimizados para uso con una estirpe celular novedosa contendría
por lo menos una concentración de aminoácido ajustada al valor
inicial, A, de un aminoácido de acuerdo con la fórmula
10 $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$.

Un multiplicador, M, cuando aplica la anterior ecuación a un
cultivo celular novedoso, se puede seleccionar, por ejemplo, de 1
a 20×10^6 células/mL. Un experto en la técnica sería capaz de
15 calcular un valor M útil al doblar la densidad celular máxima
durante la fase de crecimiento, que se puede calcular con base en
la velocidad de crecimiento.

Un multiplicador, N, cuando aplica la ecuación anterior a un
20 cultivo celular novedoso, se puede calcular, por ejemplo, al
multiplicar el IVC por el qp celular. Un experto en la técnica
sería capaz de calcular el IVC al estimar el perfil de
crecimiento, siguiendo los métodos descritos en la sección
titulada "Diseño de Medios Racionales y Formulaciones." Un
25 experto en la técnica sería capaz de calcular el qp al medir la
producción de anticuerpo o proteína recombinante sobre una base
celular.

Un factor de mantenimiento celular, Y, cuando aplica la ecuación

anterior a un cultivo celular novedoso, se puede estimar al utilizar $Y=1$ (es decir, 100% del aminoácido(s) requerido para masa celular deseada) inicialmente, y luego refinar el valor de Y (más alto o más bajo).

5

Un factor de valor inicial, F , cuando aplica la ecuación anterior a un cultivo celular novedoso, se puede estimar al utilizar $F=1.3$ (es decir, 30% de aminoácido(s) adicionales) inicialmente, y luego refinar el valor de F (más alto o más bajo).

10

Ejemplo 6

Efecto De Mantenimiento y Factores De Valor Inicial en desempeño de cultivo celular

- 15 Para demostrar que el factor de mantenimiento, Y , y el factor de valor inicial, F , son importantes/esenciales para el desempeño de cultivo celular, se siembran células CHO que expresan anti-IL-22 en 0.7×10^6 células/mL y se cultivan durante 21 días en biorreactores de 2 L con un punto de ajuste de pH de 7.0 y un
- 20 punto de ajuste de oxígeno disuelto (DO) de 30%. Se controla el pH mediante Na_2CO_3 2N/ NaHCO_3 , y se controla del DO mediante aspersión de aire (que contiene 7% de CO_2). La temperatura del cultivo es 37°C durante los primeros 3 días y se cambia a 31°C después del día 3, y el resto a 31°C hasta el final del cultivo.
- 25 Se cultivan células durante 21 días en cualesquier (1) medios que contienen aminoácidos requeridos para el título de proteína objetivo y la densidad celular pico deseada (pero no se cuenta para el factor de mantenimiento o factor de valor inicial), es decir, "Medio de Diseño Racional sin factores de mantenimiento y

000199

valores iniciales," o (2) "Medio de diseño racional."

Como se ejemplifica en las **Figuras 9 y 10**, el medio que no cuenta para factores de mantenimiento y valor inicial presenta una
5 disminución significativa en la viabilidad, alcanza cercanamente 0% en el día 21 del cultivo celular, y una disminución significativa en la densidad celular. Más aún, la **Figura 11** demuestra que en el día 21 del cultivo celular, este mismo medio solo es capaz de soportar un título de anticuerpo de 5 g/L.

10

En contraste, el Medio de Diseño Racional (que incluye factores de mantenimiento y valores iniciales) presenta mayor viabilidad, densidad celular y títulos de anticuerpo (**Figuras 9-11**). En el
15 día 21 del cultivo celular, el Medio de Diseño Racional es capaz de soportar un título de anticuerpo de 10 g/L.

Estos hallazgos sugieren que la cuenta para factores de mantenimiento y valor inicial en la determinación de la
concentración del aminoácido en el medio de cultivo celular
20 deseado mejora el desempeño celular según se mide por viabilidad celular, densidad celular, y título de polipéptido.

Ejemplo 7

Purificación de polipéptido utilizando Cromatografía De
25 Intercambio De Anión en un Modo De Particionamiento Débil

Ejemplo 7.1. Detección de alto rendimiento para establecer
particionamiento débil y condiciones de flujo pasante

000200

Se desarrolla primero un estudio de detección inicial, que determina el coeficiente de partición y/o la concentración de producto unido a la resina bajo varias condiciones de solución, que definen así las regiones de operación del particionamiento débil (WP) y modos de flujo pasante (FT) para Mab-AAB, el polipéptido de interés, y Medio TMAE-HiCap. Esta detección varía la concentración de cloruro de sodio y pH para determinar sus efectos en el grado de unión de Mab-AAB y impurezas relacionadas con el proceso (Proteína A y HCP) al medio TMAE.

10

Los niveles de Proteína A residuales en las muestras de prueba se miden utilizando un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) de Proteína A. La cantidad de agregado de alto peso molecular se mide utilizando un ensayo de cromatografía de exclusión de tamaño analítico SEC). Los niveles de proteínas de célula anfitriona (HCP) se miden utilizando un ELISA HCP. Se conducen todos los estudios de columna y detección a temperatura ambiente.

20 Se agrega cincuenta μ L de medio TMAE HiCap a cada pozo de una placa de filtro de 96 pozos. Cada pozo se equilibra en soluciones hechas de 50 mM de glicina y una cantidad variable de amortiguador Tris (que depende de la cantidad necesitada para neutralización al pH especificado en la **Tabla 9**) y cloruro de sodio (especificado en la **Tabla 10**). El pH varía de 7.6 a 9.0, y el cloruro de sodio varía de 0 mM a 80 mM.

Las soluciones amortiguadoras utilizadas en cada fila se diluyen en un sistema de pipeteo automatizado (Tecan 100 RST). La

solución madre para los amortiguadores es de 500 mM de glicina acidificados con HCl a pH 3.0, y posteriormente se neutralizan con 2 M de Base Tris a los niveles de pH indicados en la **Tabla 9**. Esta titulación resulta en un nivel de Tris que depende del pH del amortiguador. El pH del amortiguador se mide en una dilución 1 a 10 de la concentración de amortiguador en bruto, que corresponde a la dilución hecha por el sistema de pipeteo automatizado. Como un resultado de la acidificación de glicina a pH 3.0, el amortiguador contribuye aproximadamente 10 mM de resistencia iónica en la solución final. Se hacen dos inoculaciones de carga (fluido de carga) a la resina: 5 mg/mL para medir el coeficiente de partición, Kp, y 122 mg/mL para medir la capacidad de la resina para remoción de impurezas y el producto unido, Q, en equilibrio con una solución de proteína en una concentración aproximadamente igual a la concentración de carga de columna.

Tabla 9: tipo de Amortiguador y pH Objetivo en Cada Pozo

	Todas las columnas
A	50mM Glicina, 8.8mM Tris, pH 7.6
B	50mM Glicina, 13.6mM Tris, pH 7.8
C	50mM Glicina, 16.0mM Tris, pH 8.0
D	50mM Glicina, 19.6mM Tris, pH 8.2
E	50mM Glicina, 28.4mM Tris, pH 8.4
F	50mM Glicina, 37.2mM Tris, pH 8.6
G	50mM Glicina, 64.0mM Tris, pH 8.8
H	50mM Glicina, 100mM Tris, pH 9.0

Tabla 10: Niveles de NaCl (en mM) y Inoculaciones de Proteína

(mg/mL) en Cada Pozo

Todas las Filas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
MAB- AAB (mg/m L)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

En la primera etapa de la detección de alto rendimiento, cada pozo se equilibra en las condiciones de NaCl y pH como se describe en las **Tablas 9 y 10** en una relación de volumen de fase de 6:1 (300 uL de solución: 50 uL de resina). Se agita la placa durante 20 minutos, permitiendo que el equilibrio sea alcanzado. Luego se remueve la solución al centrifugar la placa de filtro. Se repite este ciclo de equilibrio tres veces.

En la segunda etapa, se inocula la resina en cada pozo con una solución de MAB-AAB a 5 mg/mL de resina con una relación de volumen de 6:1 (300 uL de solución: 50 uL de resina) en la concentración de NaCl apropiada y pH. Una solución de 36 mg/mL de Mab-AAB en 1 mM de HEPES, 10 mM de NaCl, pH 7.0 añadido con 300 ppm de Proteína A se utiliza como solución madre. La placa cargada se agita durante 20 minutos, permitiendo equilibrar la resina y la solución. El sobrenadante se remueve de la placa de filtro mediante centrifugación y se recolecta en una placa de recolección. Se determina la concentración de proteína en el sobrenadante en cada pozo mediante absorbancia a A280 nm.

En la tercera etapa, se lava la resina al agregar soluciones del NaCl especificado y las condiciones de pH se listan en la **Tabla 10**. El sobrenadante se remueve después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta etapa, se agrega NaCl 2 M para remover la proteína restante que se une a la resina. Se calculan los coeficientes de partición para cada pozo utilizando la masa eluida de las etapas 3 y 4 y el producto de concentración de la etapa 2, y se muestran en **Tabla 11**.

Tabla 11: Coeficientes de partición (Kp) para la Detección HTS de 96 pozos para MAb-AAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.22	0.32	0.35	0.17	0.24	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.17	0.16
B	0.37	0.36	0.38	0.25	0.24	0.08	0.28	0.26	0.22	0.24	0.18	0.16
C	0.63	0.48	0.47	0.27	0.15	0.20	0.31	0.28	0.26	0.20	0.23	0.16
D	1.24	1.12	0.68	0.36	0.30	0.17	0.42	0.39	0.34	0.23	0.23	0.18
E	3.24	1.89	1.05	0.59	0.35	0.15	0.68	0.58	0.41	0.29	0.21	0.18
F	8.37	3.37	1.56	0.61	0.31	0.32	0.87	0.74	0.51	0.32	0.25	0.21
G	18.36	9.49	3.16	0.82	0.49	0.34	0.91	0.88	0.69	0.39	0.24	0.20
H	125.73	23.79	6.58	1.23	0.58	0.43	1.18	1.02	0.78	0.42	0.27	0.24

Como se muestra en **Tabla 11**, se puede utilizar el valor Kp para describir regiones en donde el MAb-AAB une al medio TMAE con diferentes fuerzas. La fuerza de unión MAb-AAB al medio TMAE se puede manipular al variar las condiciones de pH y concentración de cloruro en de flujo pasante ($K \leq 0.1$), particionamiento débil ($0.1 < K < 20$), y zonas de unión ($K \geq 20$).

El sobrenadante de la etapa de carga de todos los pozos de cada zona se muestrea y presenta para análisis de Proteína A. Se resumen los resultados de ensayo de estas muestras en la **Tabla 12**. Existe una región de pH y conductividad en la que la etapa de cromatografía TMAE proporciona remoción muy significativa de la Proteína A con pérdida de proteína limitada a la resina. Se encuentra esta región por estar cercanamente correlacionada con el valor de coeficiente de partición, Kp, y ningún pH específico o concentración de cloruro.

Tabla 12: Valores de Remoción Log de Proteína A (LRV) para datos de unión MAb-AAB de la Detección HTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.11	1.89	2.12	1.85	1.22	1.00	1.63	1.02	1.00	0.92	0.85	1.02
B	2.79	2.37	2.42	1.96	1.23	1.13	1.77	1.81	1.22	0.85	0.94	1.52
C	>3.05	>3.03	2.74	2.16	1.37	1.11	2.25	2.15	1.96	1.16	1.06	0.95
D	>3.41	>2.98	>3.06	2.50	1.94	1.18	3.39	3.11	2.57	1.41	1.02	0.89
E	>2.87	>2.93	>3.01	>2.95	2.13	1.75	>3.09	3.27	3.09	1.66	1.89	0.99
F	>2.64	>2.89	>2.99	>3.11	2.29	1.82	>3.07	>3.11	>3.15	2.19	1.24	0.84
G	>2.33	>2.58	>2.89	>3.07	2.41	2.14	>3.09	>3.11	>3.14	2.80	1.46	0.85
H	>1.63	>2.36	>2.76	>3.01	2.86	2.37	>2.98	>3.05	>3.15	3.16	3.45	0.85

Ejemplo 7.2. Series de Columna bajo condiciones de flujo pasante

Se desarrolla el siguiente experimento en el modo de flujo pasante (FT), en donde el MAb-AAB interactúa solo muy débilmente con la columna. Se desarrollan dos series con inoculaciones cargadas de 110 mg/ml y 200 mg/ml de resina.

Para todas las series de cromatografía de intercambio de anión TMAE (HiCapM) descritas, se utilizan las siguientes condiciones (se notan excepciones en las descripciones experimentales individuales).

5

Velocidad de flujo operacional - 150-300 cm/hr

Equilibrio 1 - 50 mM de Tris, NaCl 2.0 M, pH 7.5 (5 volúmenes de columna)

10

Equilibrio 2 - como se especifica, aproximadamente equivalente al pH de carga y el contenido de cloruro

Lavado post-carga - como se especifica, aproximadamente equivalente al pH de carga y el contenido de cloruro

Amortiguador de Pelado - 50 mM de Tris, NaCl 2.0 M, pH 7.5 (5 volúmenes de columna)

15

Cromatografía de Proteína A Mabselect

Se purifica el cultivo que contiene el anticuerpo monoclonal a escala Piloto utilizando una columna MabSelect (2,389 mL) conectada a un sistema de cromatografía Millipore K-prime 400. Una columna de Proteína A Mabselect se equilibra con 5 volúmenes de columna de 50 mM de Tris/150 mM de NaCl, pH 7.5 en una velocidad de flujo de 300 cm/hr. Luego se carga la columna con una carga de aproximadamente 40 mg de producto/ml de resina. Esto se sigue por un lavado de volumen de columna 5 (CV) en NaCl 1 M, 50 mM de Tris, pH 7.5, y un lavado 5CV que contiene 10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, pH 7.5 de lavado. Luego se eluye la columna utilizando 50 mM de glicina, 75 mM de NaCl, pH 3.0. Se neutraliza el grupo de producto a pH 7.6 utilizando Tris 2 M, pH 8.5. El

pico neutralizado tiene una concentración de cloruro de aproximadamente 90 mM.

Cromatografía TMAE HiCap (M)

5

Se purifica adicionalmente el grupo de Proteína A neutralizado durante la etapa TMAE con soluciones de equilibrio, carga, y lavado a pH 7.5 con 50 mM de Tris y 75 mM cloruro de sodio. Se utilizan cinco volúmenes de columna de lavado. Las dimensiones de columna e inoculaciones de carga para estos dos estudios son: Serie 1: 7.0 cm de diámetro x 20.6 cm de alto de lecho (volumen - 793 mL) con una concentración de carga de 11.9 mg/mL; y Serie 2: 7.0 cm de diámetro x 13 cm de alto de lecho (volumen - 500 mL) con una concentración de carga de 17.6 mg/mL.

15

Estas condiciones de carga están en la región de flujo pasante (FT) (**Tabla 13**). Se utilizan estudios de unión de tanda para medir el coeficiente de partición (K_p), y el producto unido se determina por proteína en el pelado de columna al utilizar absorbancia UV. Este método para determinar el producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a elución isocrática del producto durante el lavado. Se miden los niveles de Proteína A, HCP y agregados de alto peso molecular (HMW) en la piscina de carga y producto, y se calcula el grado de remoción. Se presentan los resultados en la **Tabla 13**. Existe pobre remoción de la Proteína A y HMW, y modesta reducción en los niveles HCP.

20

25

Tabla 13: Remoción de HCP, Proteína A, y HMW bajo condiciones FT

000287

5

Serie	Inocul ación de carga (mg/mL)	Coefici ente de partici ón (Kp)	Produc to unido (mg/mL de resina)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (Pliegue)	Recupe ración (%)
1	110	0.17	1.4	2.3	0.1	-	96
2	200	0.17	3.3	2.0	<0.1	1.5	96

10 * Los niveles de impureza son 38.5 ppm de ProA y 51,943 ppm de HCP (Serie 1), 8.8 ppm de ProA y 25,398 ppm de HCP (Serie 2).

**Ejemplo 7.3. Series de columna bajo condiciones de
particionamiento débil (alta inoculación de producto)**

15

Cromatografía de intercambio de anión TMAE (HiCap M)

20

25

Se desarrollan varias series de Proteína A Mabselect esencialmente como se describe en el Ejemplo 7.2 para generar el material de carga para estas series. El grupo de anticuerpo parcialmente purificado de la etapa de Proteína se purifica adicionalmente sobre la columna TMAE. La carga de la columna TMAE está en 50 mM de Tris, pH 8.2. El diámetro de columna es 0.5 cm y el alto de lecho es 10 cm de alto de lecho (volumen - 2.0 mL). En la columna se inocula una carga de 500 mg/mL de resina, con una concentración de carga de 27.7 mg/mL.

La columna se equilibra con 5CV de una solución que contiene 50 mM de Tris, NaCl 2M, pH 7.5 seguido por otra etapa de Equilibrio que comprende una solución de 50 mM de Tris, pH 8.2. La columna

000208
luego se carga con 500 mg de producto/mL de resina con el pico de Proteína A neutralizada de la etapa anterior y se recupera el producto en el efluente de columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado.

5

Estas condiciones de carga están en la región de particionamiento débil. Se utilizan estudios de unión de tanda para medir el coeficiente de partición (K_p), y unión de producto en altas concentraciones de proteína. A pH 8.2, y un contenido de cloruro aproximado de 12 mM, el coeficiente de partición, K_p , se estima por ser 1.9 (de interpolación de los datos establecidos de la detección HTS).

10

Los niveles de HCP y Proteína A se miden en tres fracciones durante la etapa de carga que representa inoculaciones de carga de aproximadamente 250, 375, y 500 mg/ml de resina. Los resultados del ejemplo 7.3 están presentes en la **Tabla 14**. Estos resultados demuestran que se pueden lograr inoculaciones de producto muy altas en el modo de particionamiento débil, sin desintegración de impurezas. La reducción excelente en HCP y Proteína A se alcanza, junto con un reducción del 50% en contenido HMW. En comparación con los resultados para operación en el modo de flujo pasante en la **Tabla 13**, la remoción de impurezas es mucho mejor en el modo de particionamiento débil.

25

Tabla 14: Remoción de HCP, Proteína A y HMW para una inoculación de carga TMAE de 500 mg/ml

	Fracción temprana (250 mg/ml)	Fracción media (375 mg/ml)	Fracción tardía (500 mg/ml)	Grupo de Producto final (ppm)
HCP Residual ppm (ng/mg de producto)	< 7.6	< 7.6	< 7.6	< 7.6
Valor de Remoción Log de HCP (LRV)	> 3.5	> 3.5	> 3.5	> 3.5
Proteína A Residual ppm (ng/mg de producto)	0.3	No determinado	0.1	0.6
Valor de remoción Log de ProA (LRV)	2.9	No determinado	2.3	2.5
HMW	No determinado	No determinado	No determinado	2 veces de remoción

* Las impurezas en la carga son 25,398 ppm de HCP, 99.5 ppm de Proteína A, y 2.3% HMW

Ejemplo 7.4. Series de columna bajo condiciones de particionamiento débil (estudios consistentes)

Para confirmar adicionalmente el desempeño de la columna TMAE en la región de particionamiento débil, se diseñan varias series que varían el pH y la concentración de NaCl en la carga para probar consistencia del proceso. Se desarrollan todas las series en una inoculación de carga de 250 mg/mL de resina. Se desarrollan varias series de Proteína A Mabselect esencialmente como se describe en Ejemplo 7.2 para general el material de carga para estas series. El factor que solo varía en aquellas series es la

000210

concentración de cloruro de sodio en la elución de Proteína A, que se varía para coincidir la concentración NaCl en la carga TMAE para un experimento particular. Se equilibran las columnas con amortiguadores Equil 2 y se lavan con amortiguadores de Lavado que tienen aproximadamente el mismo pH y contenido de cloruro de sodio de la carga.

Estas condiciones de carga están en la región de particionamiento débil. Se utilizan estudios de unión de tanda para medir el coeficiente de partición (K_p). Se clasifican las series mediante los coeficientes de partición listados en la **Tabla 15**. Se determina el producto unido al medir la proteína en el pelado de columna utilizando absorbancia UV, y rangos de 7.8–25.3 mg/mL. Los resultados de Proteína A, HCP y HMW de estos experimentos también se presentan en la **Tabla 15**. Se encuentra que la remoción de todas las impurezas es consistente en rangos de operación que cubren 13.5–38.8 mM de cloruro total y pH 7.8–8.4.

Tabla 15: Estudios de Consistencia de Proceso en Remoción de HCP, Proteína A, y HMW en Modo WP

Concentración de NaCl (mM)	Kp	Producto Unido (mg/mL)	pH	HCP en Carga (ppm)	Proteína A en carga (ppm)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (Pliegue)	Recuperación (%)
38.8	0.26	9.4	7.8	26,391	493.5	3.7	1.8	2.0	92
13.5	0.41	7.9	7.8	12,821	69.2	3.3	>1.9	1.8	87
27.4	0.50	8	8.0	23,465	252	3.6	2.2	3.2	91
18.5	0.73	7.8	8.0	21,626	308	3.7	>3.2	2.9	90
23.5	0.80	9.5	8.1	18,004	343	3.2	>3.2	3.5	94
27.7	0.86	9.5	8.2	24,821	280	3.6	>3.2	2.6	99
18.5	1.48	10	8.2	17,669	252	3.7	>3.1	3.9	95
22.0	5.35	25.3	8.4	29,293	533	3.6	>2.9	2.3	90

* Los niveles de impureza son 38.5 ppm de ProA y 51,943 ppm de HCP (Serie 1), 8.8 ppm de ProA y 25,398 ppm de HCP (Serie 2).

+ incluye la contribución de ión Cl de NaCl, amortiguadores y títulos

Ejemplo 7.5. Resumen

A partir de estos estudios, se puede ver que la remoción de Proteína A (LRV) varía fuertemente con Kp, mientras que HCP LRV es excelente en todos los valores de Kp en o por encima de 0.26, pero más reducido en Kp = 0.17 (bajo condiciones de flujo pasante). La remoción de proteína de célula anfitriona es sobre un log inferior para condiciones de flujo pasante comparados con condiciones de particionamiento débil, aún para una inoculación de carga reducida. El producto unido varía de 7.8-25 mg/ml para estas condiciones de particionamiento débil en esta combinación de resina y anticuerpo monoclonal. El coeficiente de partición parece ser óptimo entre 0.41<Kp<5.4. Este no parece ser óptimo para Kp=0.17 y un producto unido de 1.4-3.3mg/mL, las condiciones

del Ejemplo 7.2.

Estos estudios sugieren un modo alternativo de purificar un polipéptido producido utilizando cultivo celular de medios de
5 diseño racionales, que significativamente reducirá la presencia de impurezas, agregados de alto peso molecular, ADN, proteínas de célula anfitriona, etc.

REIVINDICACIONES

000213

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular
5 que comprende:

(1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica
10 un polipéptido de interés; y

b. un medio de cultivo celular deseado, que comprende una
concentración de un aminoácido que se calcula para uso
en masa celular, una concentración del aminoácido que
15 se calcula para uso en mantenimiento celular, y una
concentración del aminoácido que se calcula para
incorporación en el polipéptido de interés; y

(2) mantener el cultivo celular bajo condiciones que
20 permiten expresión del polipéptido de interés.

2. Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular
que comprende:

25 (1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica
un polipéptido de interés; y

000214

- b. un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés, cuyas concentraciones se multiplican por un factor de valor inicial; y

- (2) mantener el cultivo celular bajo condiciones que permiten expresión del polipéptido de interés.

3. Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:

- (1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

- a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y

- b. un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad del título de polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de

mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial; y

(2) mantener el cultivo celular bajo condiciones que permiten expresión del polipéptido de interés.

4. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente un método para recuperar un polipéptido purificado de un fluido de carga, que comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio en un columna en condiciones de operación que originan que el medio se una a por lo menos 2.8 mg de polipéptido por mL de medio, en donde el medio se selecciona del grupo que consiste de un medio de intercambio de ión cargado, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, y una resina de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado; y

recuperar el polipéptido purificado del efluente de columna.

5. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente un método para recuperar un polipéptido purificado de un fluido de carga, que comprende las etapas de:

pasar el fluido de carga a través de un medio en un columna en condiciones de operación definidas por un

coeficiente de partición de por lo menos 0,1400216

recuperar el polipéptido purificado del efluente de columna.

- 5 6. Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:

(1) proporcionar un cultivo celular, que comprende

- 10 a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y
- b. un medio de cultivo celular de partida, en donde el volumen del medio de cultivo celular de partida es
- 15 aproximadamente 60-99% del volumen de un volumen de medio de cultivo celular deseado;

- (2) proporcionar un medio de cultivo celular de alimentación al cultivo celular de acuerdo con la etapa
- 20 (1), en donde el volumen del medio de cultivo celular de alimentación es aproximadamente 1-40% del volumen medio de cultivo celular deseado, y en donde el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso
- 25 en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés; y

(3) mantener el cultivo celular bajo condiciones que permiten expresión del polipéptido de interés.

7. Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:

(1) proporcionar un cultivo celular, que comprende

a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y

b. un medio de cultivo celular de partida, en donde el volumen del medio de cultivo celular de partida es aproximadamente 60-99% del volumen de un volumen de medio de cultivo celular deseado;

(2) proporcionar un medio de cultivo celular de alimentación al cultivo celular de acuerdo con la etapa (1), en donde el volumen del medio de cultivo celular de alimentación es aproximadamente 1-40% del volumen medio de cultivo celular deseado, y en donde el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A, de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para

una densidad celular pico deseada del cultivo celular,
N es un multiplicador para una concentración deseada
del polipéptido de interés, Y es un factor de
mantenimiento celular, y F es un factor de valor
5 inicial; y

(3) mantener el cultivo celular bajo condiciones que
permiten expresión del polipéptido de interés.

10 8. El método de la reivindicación 7, en donde el medio de
cultivo celular de partida comprende una concentración, B,
del aminoácido de acuerdo con la fórmula $B=[A-(Z \cdot V)]/(1-V)$,
en donde Z es una concentración del aminoácido en el medio
de cultivo celular de alimentación, y V es un volumen del
15 medio de cultivo de alimentación como una proporción del
volumen medio de cultivo celular deseado.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5,
7, y 8, en donde Y es 0 a aproximadamente 1.5.

20 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5,
7, y 8, en donde F es aproximadamente 1 a aproximadamente
1.5.

25 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5,
7, y 8, en donde Y es 0 a aproximadamente 1.5 y F es
aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en

000219

donde el medio de cultivo celular deseado comprende más de o igual a aproximadamente 3 mM de tirosina.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
5 donde el medio de cultivo celular deseado comprende entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de leucina.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
10 donde el medio de cultivo celular deseado comprende entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de lisina.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
donde el medio de cultivo celular deseado comprende entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de treonina.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
donde el medio de cultivo celular deseado comprende entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de prolina.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
20 donde el medio de cultivo celular deseado comprende entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de valina.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en
25 donde la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, prolina, y valina en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 35 mM y aproximadamente 150 mM.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, y valina en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 60% y aproximadamente 80% de la concentración de los aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular deseado.
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración combinada de los aminoácidos esenciales en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50% de la concentración de los aminoácidos totales en el medio de cultivo celular deseado.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado está entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración de prolina en el cultivo celular se mantiene en más de aproximadamente 1 mM.
23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la concentración de prolina en el cultivo celular se mantiene en más de aproximadamente 2 mM.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde el cultivo celular es un cultivo celular a gran

000221

escala.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde las células son células animales.

5

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 6-25, en donde se purifica el polipéptido.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el medio es un medio definido.

10

28. Un polipéptido producido de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27.

- 15 29. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido como se establece en la reivindicación 28 y un portador farmacéuticamente aceptable.

30. Un método de cultivo celular que comprende:

20

(1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

a. células; y

25

b. un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular y una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular; y

000222

- (2) mantener el cultivo celular bajo condiciones que permitan crecimiento y replicación de las células en el cultivo celular.

5 31. Un método de cultivo celular que comprende:

- (1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

a. células; y

10

- b. un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A' , de acuerdo con la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial; y

15

20

- (2) mantener el cultivo celular bajo condiciones que permitan crecimiento y replicación de las células en el cultivo celular.

25

32. El método de la reivindicación 30 o 31, en donde el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala.

33. El método de la reivindicación 30 o 31, en donde las células son células animales.

34. Un medio de cultivo celular, que comprende una concentración de aminoácidos total de entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM.
- 5 35. Un medio de cultivo celular para uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración de aminoácidos total de entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM.
- 10 36. Un medio de cultivo celular para uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido
15 que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés.
37. Un medio de cultivo celular, que comprende una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A' , de acuerdo con
20 la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, M es un multiplicador para densidad celular pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial.
- 25 38. Un medio de cultivo celular para uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración de aminoácido ajustada al valor inicial, A , de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es una

concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor de valor inicial.

10 39. El medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en donde el medio de cultivo celular es un cultivo celular a gran escala.

15 40. El medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en donde el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular animal.

20 41. El medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 34-40, en donde el medio de cultivo celular es un medio definido.

25 42. Un método para determinar una concentración optimizada de un aminoácido utilizada en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende:

- (1) determinar la concentración de aminoácido requerida para la masa celular de las células en una densidad celular objetivo;

- (2) determinar la concentración de aminoácido requerida para producir el polipéptido de interés en un título de polipéptido objetivo;

5

- (3) determinar la concentración de aminoácido requerida para mantenimiento celular de las células; y

10

- (4) agregar las concentraciones obtenidas de la etapa (1), etapa (2), y etapa (3) para proporcionar una concentración optimizada del aminoácido utilizada en el medio de cultivo celular para la producción del polipéptido de interés.

- 15 43. Un método para determinar una concentración de aminoácido optimizada, A, de un aminoácido utilizado en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende:

- 20 (1) determinar la concentración de aminoácido, X, requerida para la masa celular de las células en una densidad celular establecida;

- 25 (2) determinar la concentración de aminoácido, P, requerida para producir el polipéptido de interés en un título de polipéptido establecido; y

- (3) determinar la concentración de aminoácido optimizada, A, de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (M \cdot Y \cdot X)] \cdot F$,

en donde M es un multiplicador para una densidad celular objetivo deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración del polipéptido objetivo deseada de interés, Y es un factor de mantenimiento celular; y F es un factor de valor inicial.

5

44. El método de la reivindicación 42 o 43, en donde el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala.

10

45. El método de la reivindicación 42 o 43, en donde el cultivo celular es un cultivo celular animal.

RESUMEN

Esta invención se relaciona con métodos para diseñar racionalmente medios de cultivo celular para uso en cultivos
5 celulares, por ejemplo, cultivos celulares empleados en producción de polipéptido; medios de cultivo celular diseñados con los métodos descritos; métodos para producir un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, utilizando tales medios; polipéptidos producidos utilizando los métodos y medios descritos
10 aquí; y composiciones farmacéuticas que contienen tales polipéptidos. Los medios diseñados racionalmente contienen una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que
15 se calcula para incorporación en el polipéptido de interés. Los medios diseñados racionalmente pueden contener una concentración ajustada al valor inicial, A, de por lo menos un aminoácido que se calcula de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es la concentración del aminoácido que se utiliza por
20 unidad de masa celular, P es la concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es el multiplicador para la densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es el multiplicador para la concentración del polipéptido deseada de
25 interés, Y es el factor de mantenimiento celular; y F es el factor de valor inicial. También se pueden utilizar estos medios diseñados racionalmente para producir un medio de cultivo celular de partida que comprende una concentración, B, de por lo menos un aminoácido de acuerdo con la fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, en donde

Z es una concentración del aminoácido en el medio de cultivo celular de alimentación, y V es un volumen del medio de cultivo de alimentación como una proporción del volumen medio de cultivo celular deseado.

000229

Figura 1

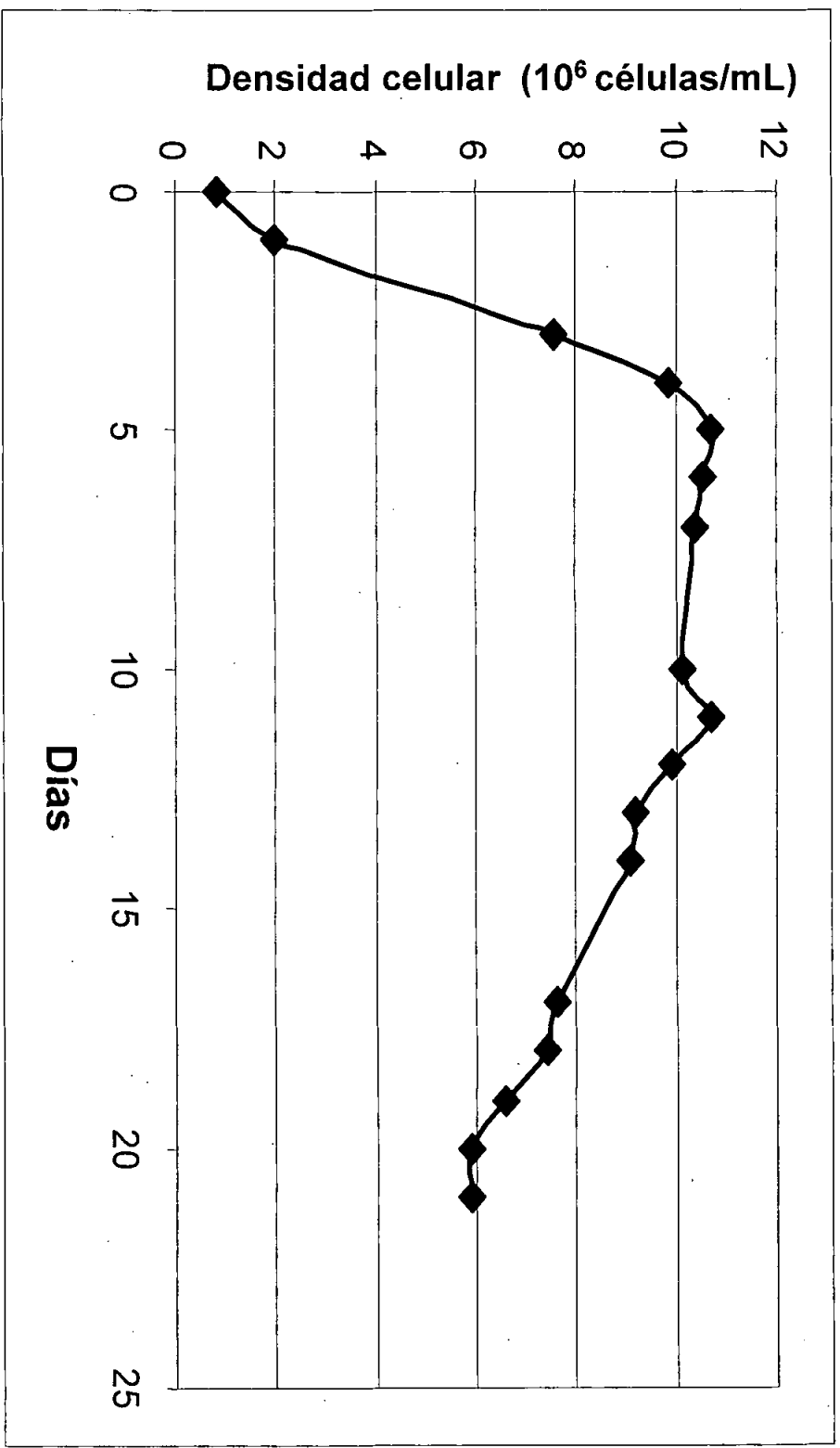


Figura 2

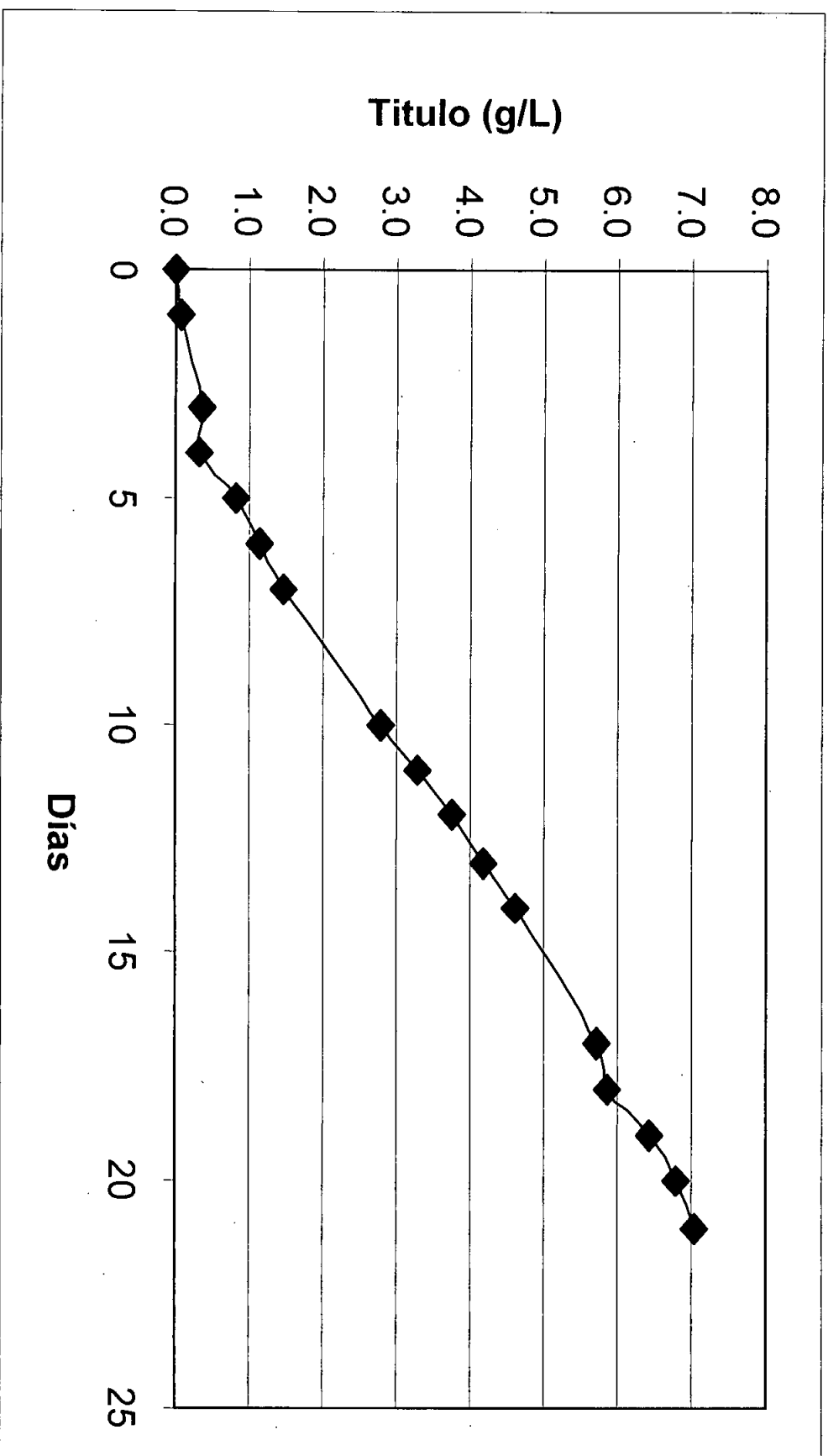


Figura 3

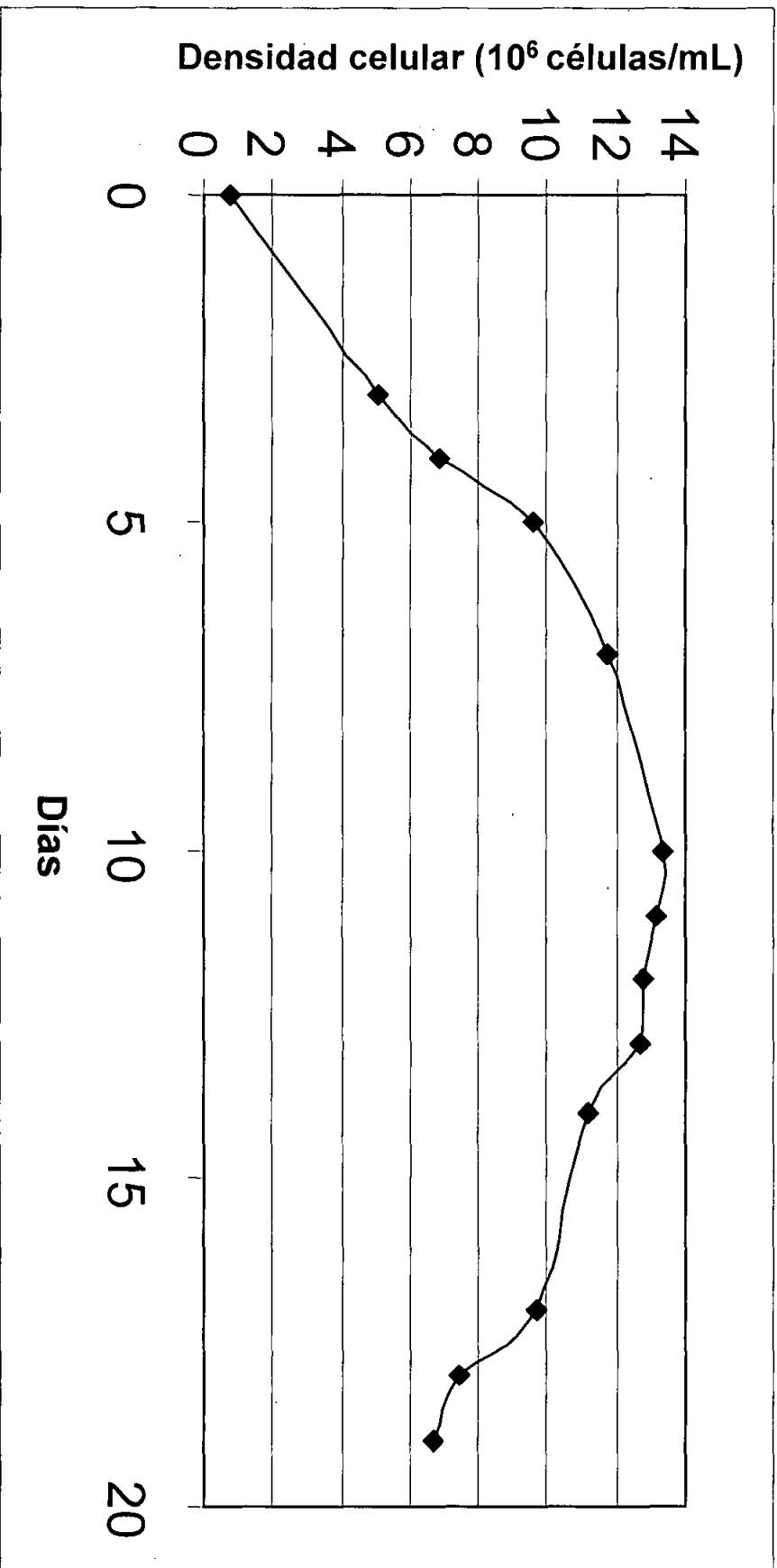


Figura 4

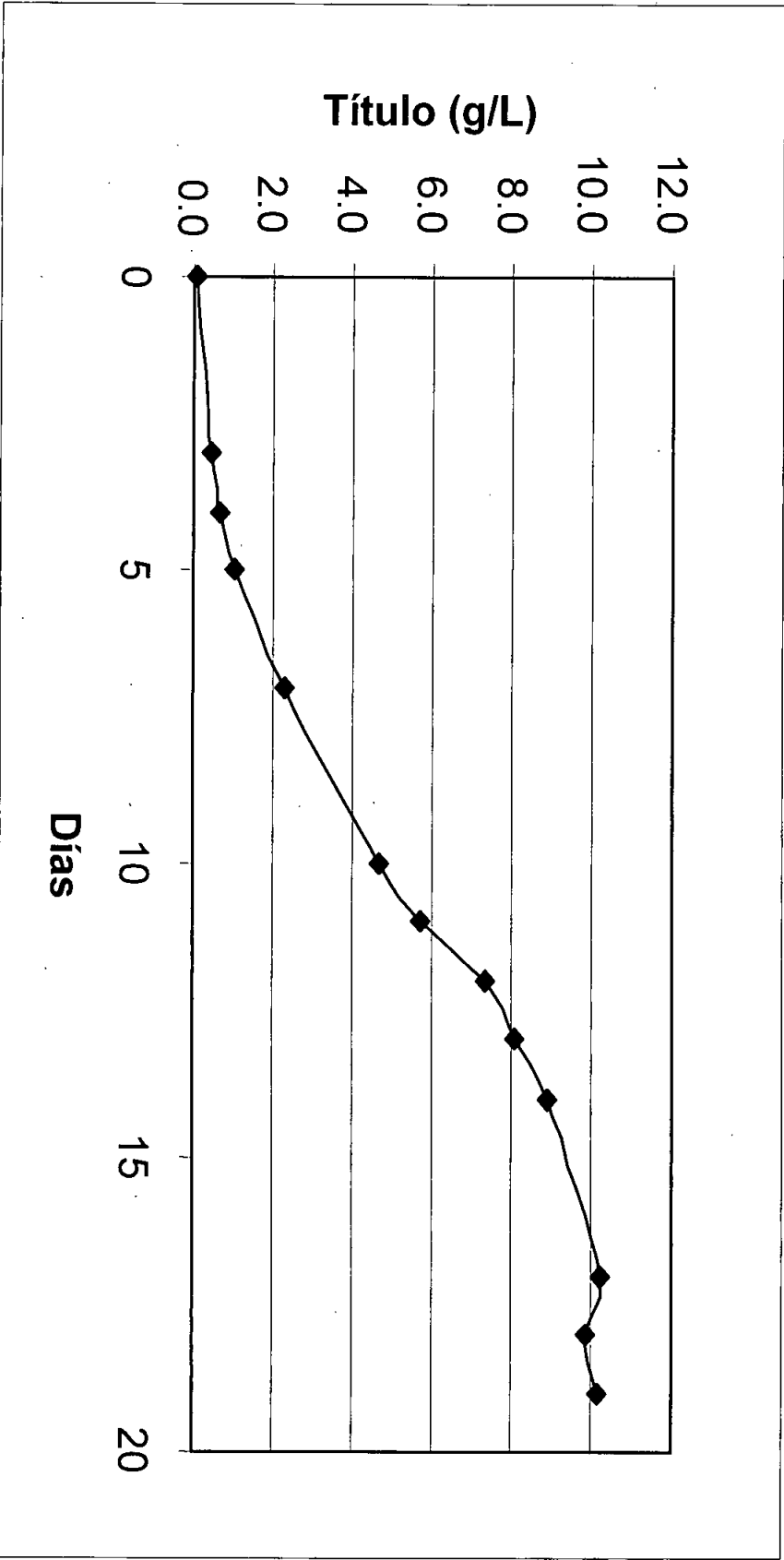


Figura 5

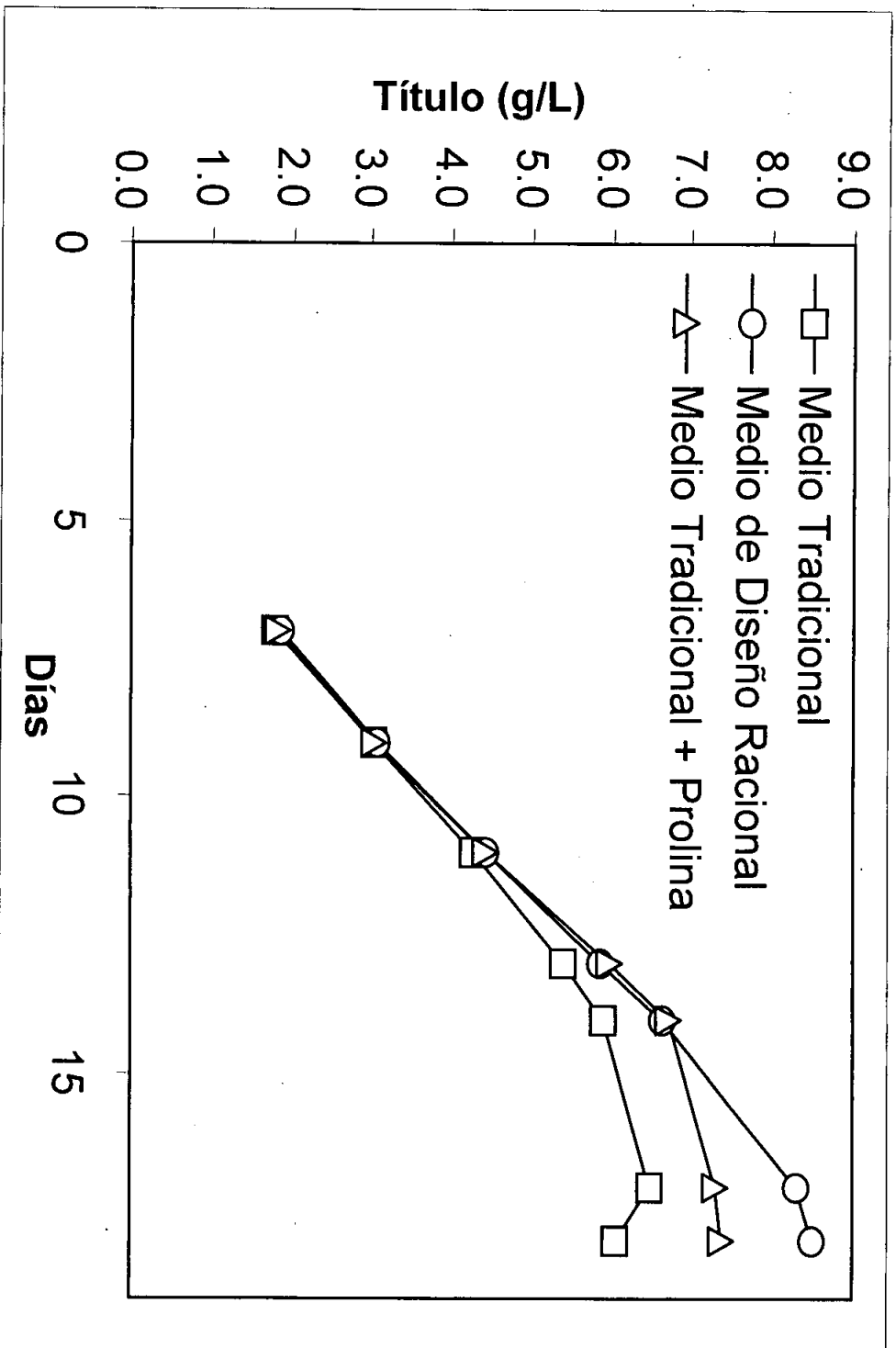


Figura 6

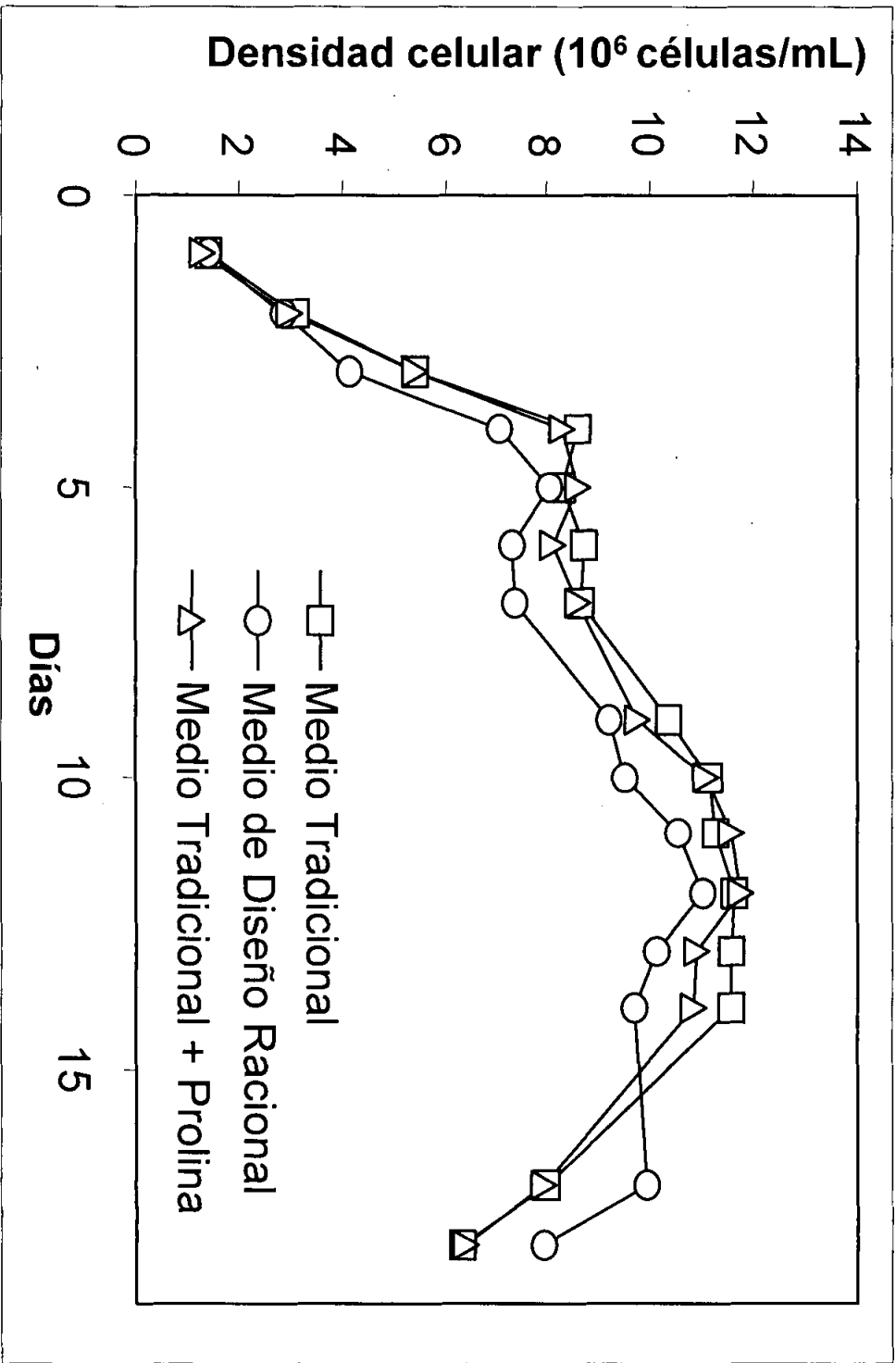


Figura 7

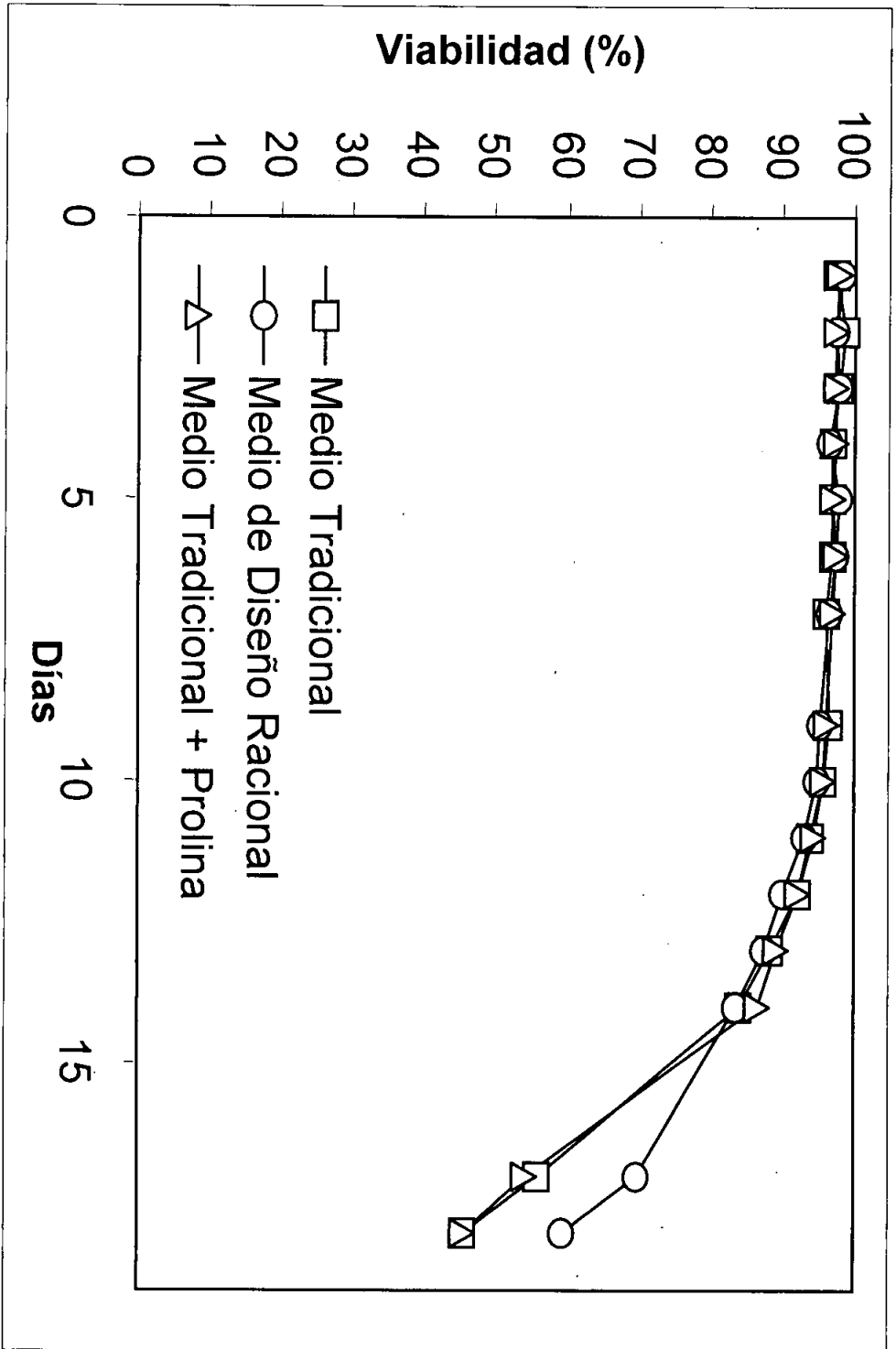


Figura 8A

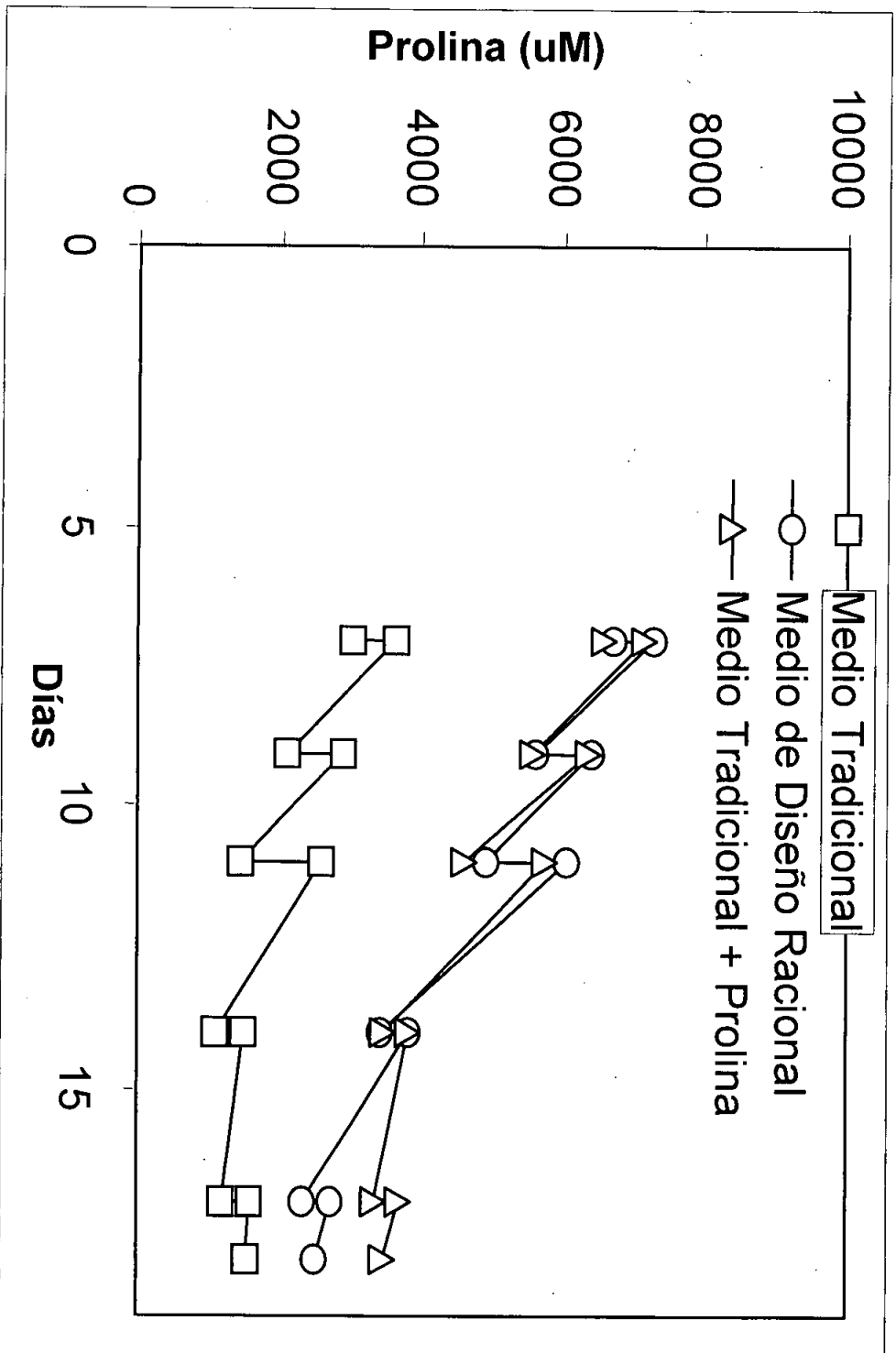


Figura 8B

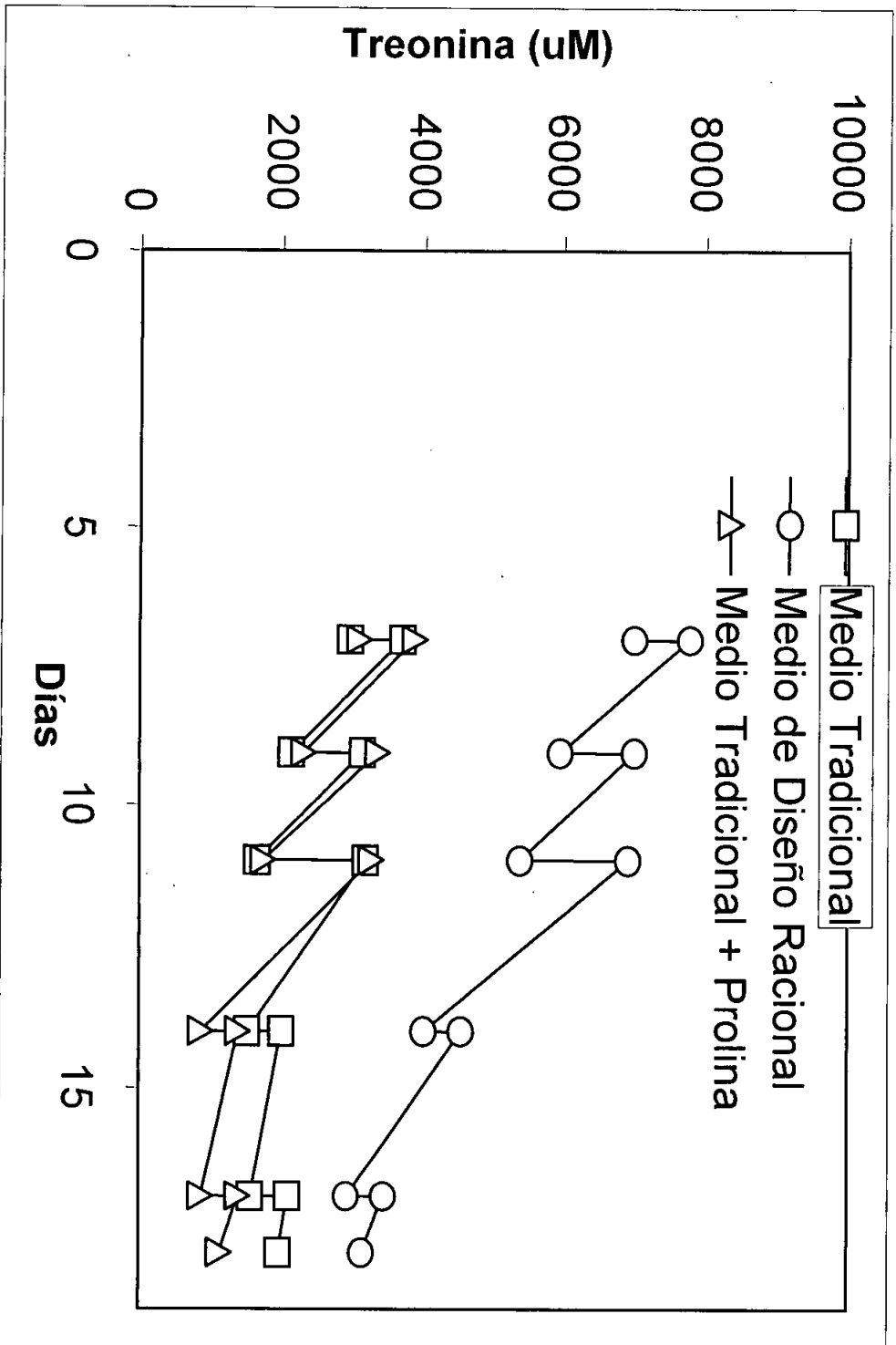


Figura 8C

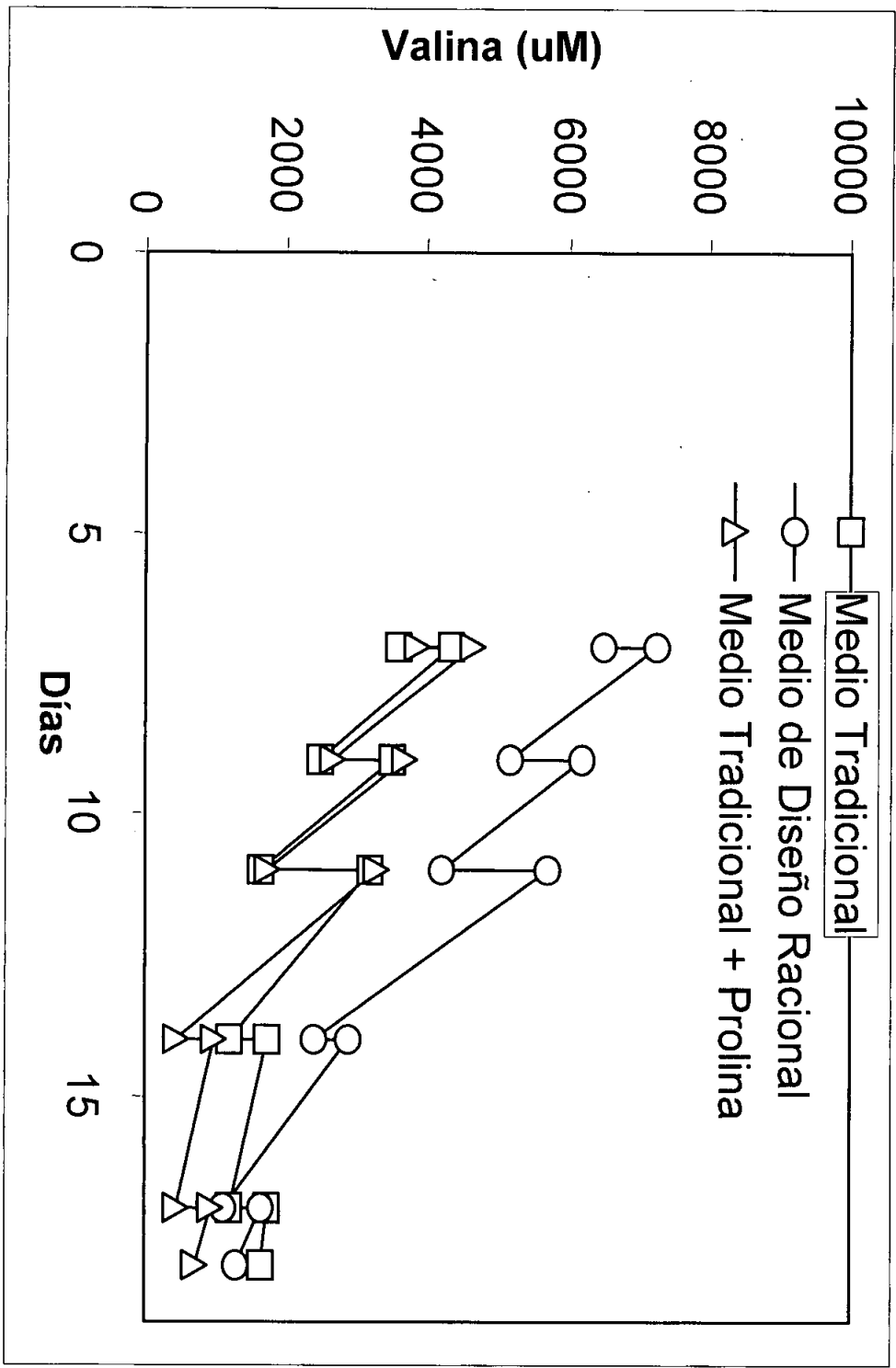


Figura 8D

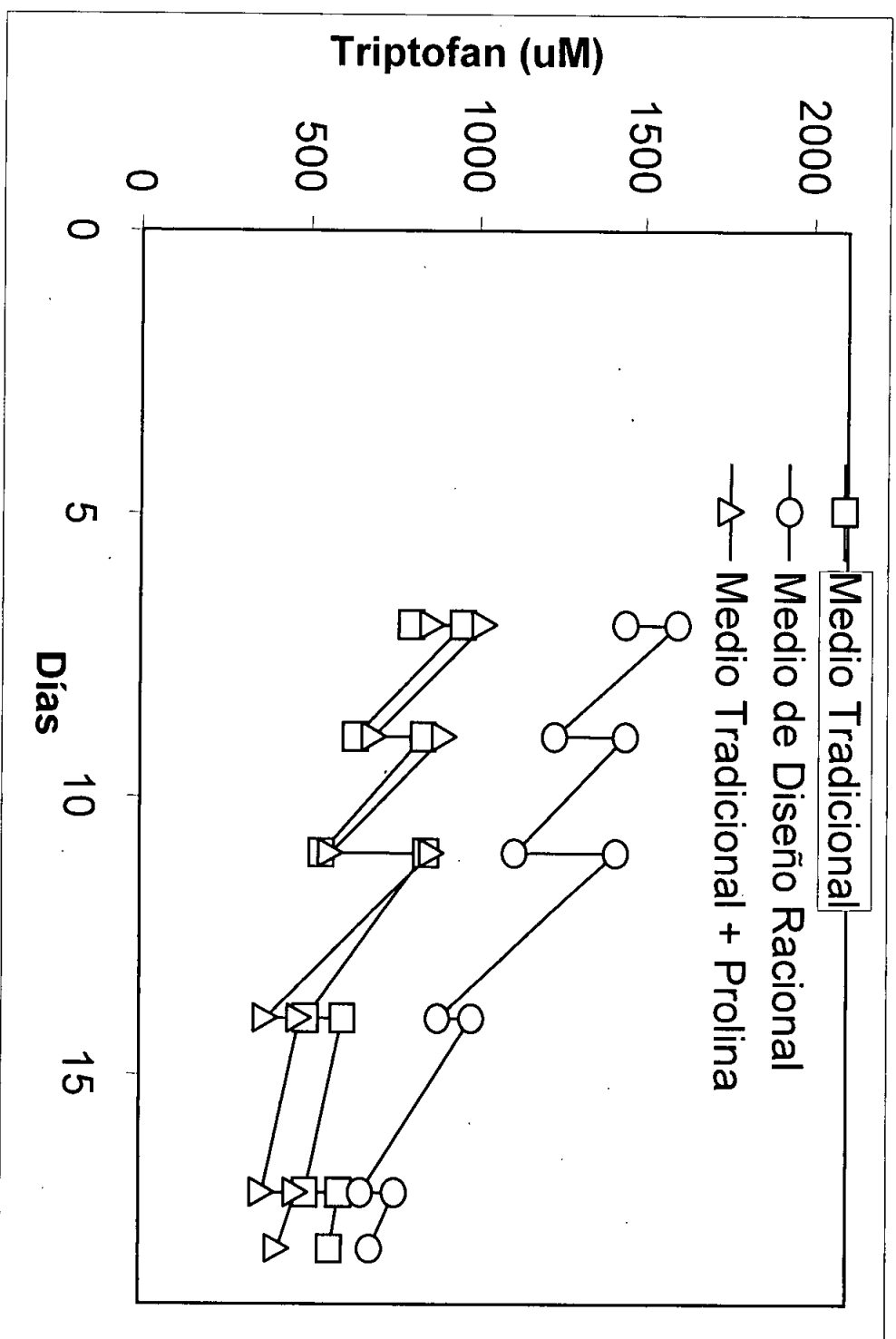


Figura 8E

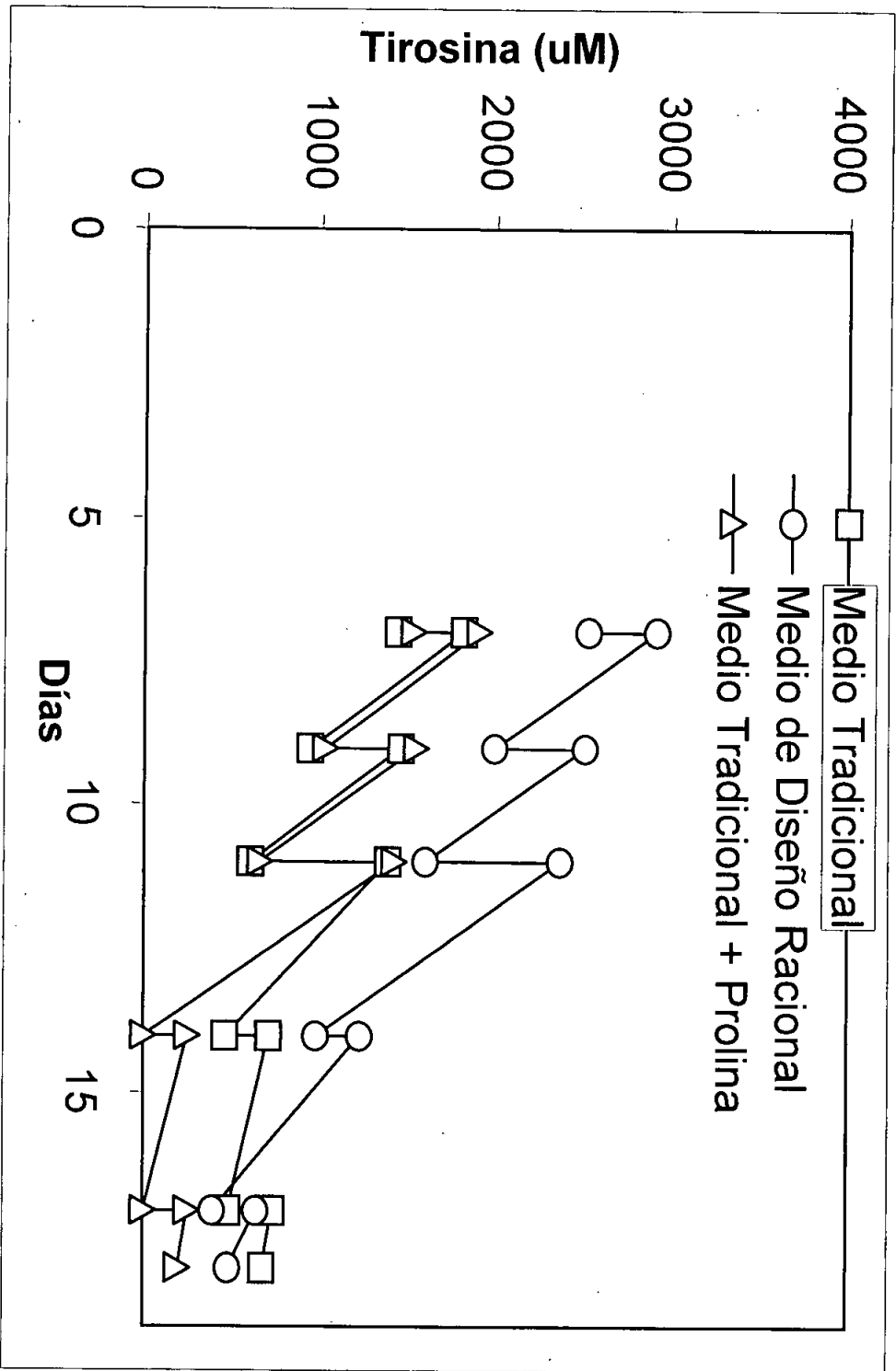


Figura 9

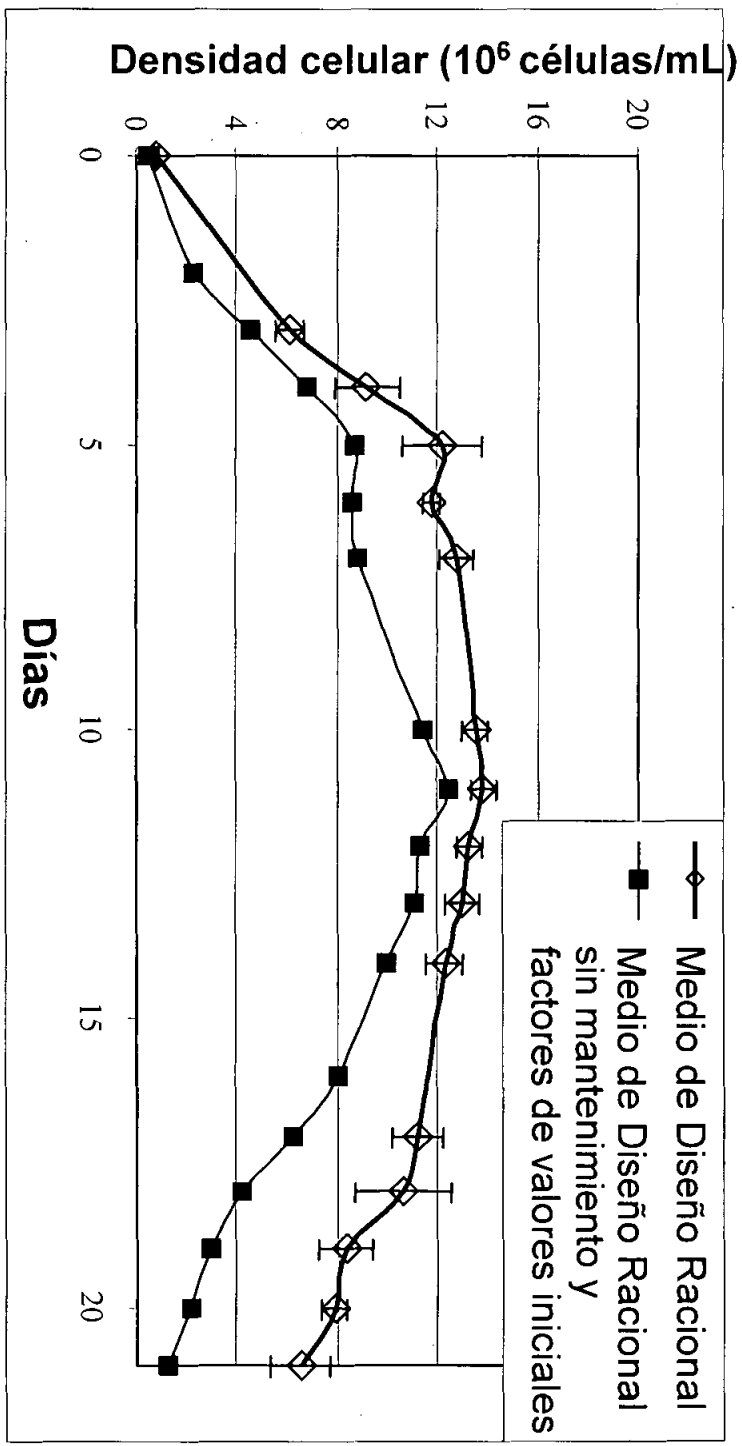


Figura 10

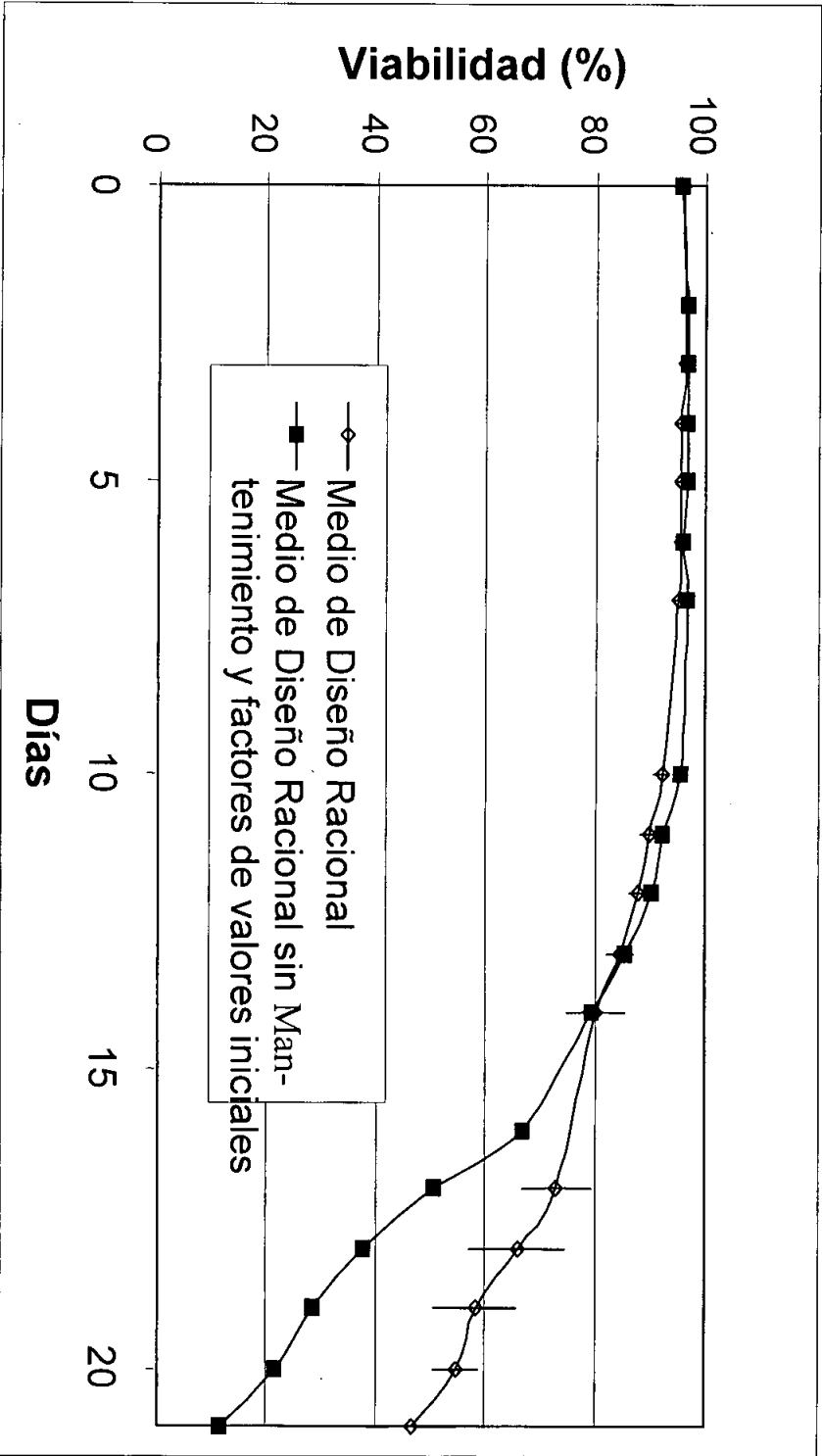
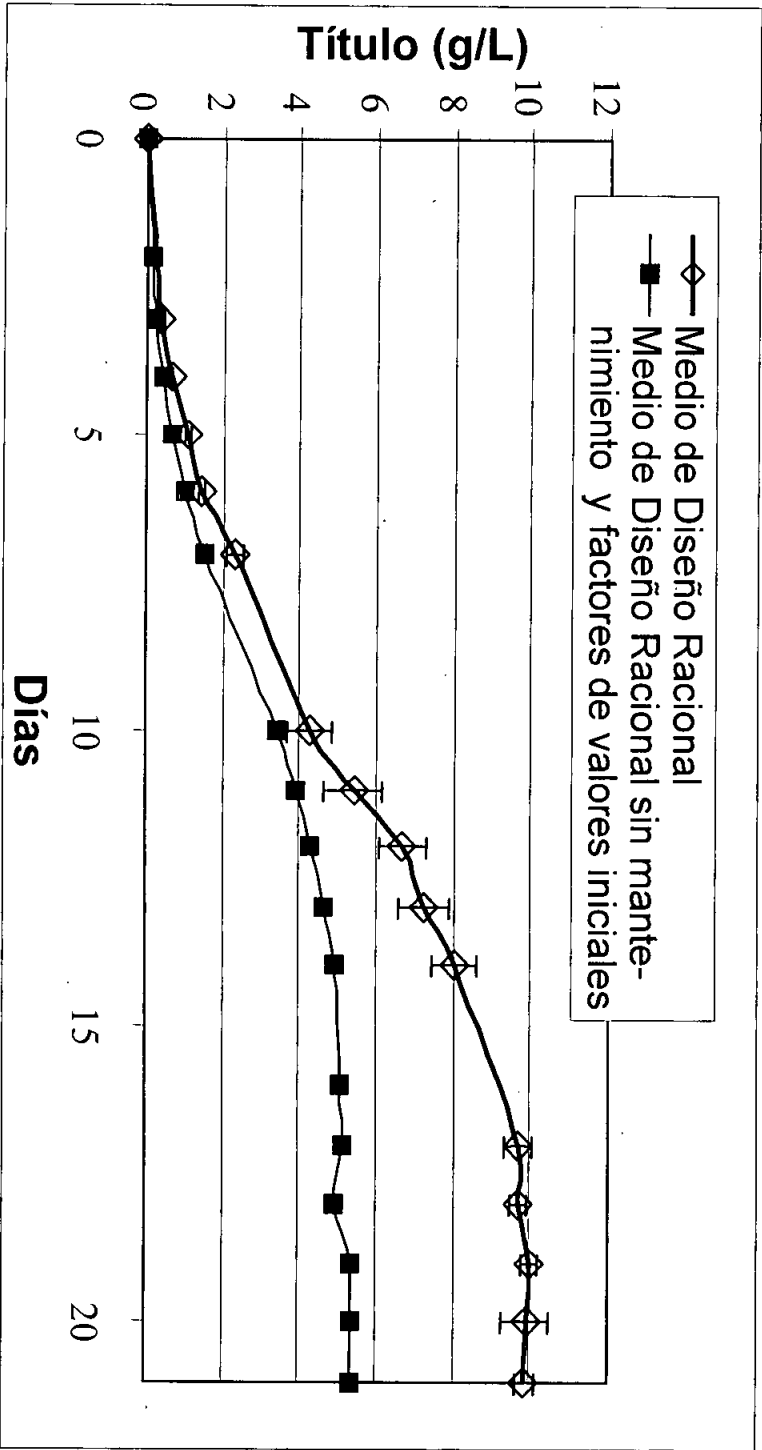


Figura 11



TRADUCCIÓN OFICIAL No. 446/08 de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 4 de agosto de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por WYETH para su representación en relación con asuntos de propiedad industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Michelle L. McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

(Fdo.) Michelle L. McGowan

[Sello] MICHELLE L. McGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
COMO NOTARIO PUBLICO DEL ESTADO DE BOGOTA D.C.
CERTIFICO QUE EL COPIADO RESPECTIVO LA
PRESENTE COPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL TENIDO A LA VISTA

30 ABR 2009

Eduardo Durán Gómez
NOTARIO 38 DE BOGOTA, D.C.

246

CERTIFICADO

- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 28 de julio de 2008
- 7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A334737
- 9. Sello/Timbre:
- 10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

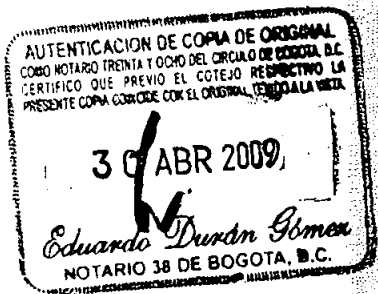
=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

Maria Teresa Lara R.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



246

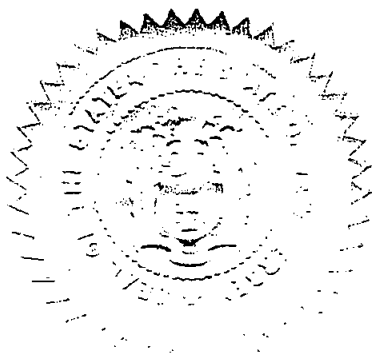
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A334737
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



[Handwritten signature]

OFICIO NOTARIO TREINTA Y OCHO DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.
CERTIFICO QUE PREVIO EL COBRO RESPECTIVO LA
PRESENTE COPIA CORRIGE CON EL ORIGINAL TENIDO A LA VISTA.

30 ABR 2009

Eduardo Durán Gómez
NOTARIO 38 DE BOGOTA, D.C.

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

all members of the law firm Baker & McKenzie Colombia S.A., with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient Power of Attorney to obtain the protection of my (our) industrial property for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before administrative, and judicial authorities or persons, in all matters concerning the following: a) obtainment of patents, including filing of assignments, change of name or address, and at my (our) specific direction, voluntary cancellation, defending and filing of oppositions, cancellations, annulment and criminal actions, and in general the civil, criminal, and administrative processes relating to those rights.

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA

todos miembros de la firma de abogados Baker & McKenzie Colombia S.A., con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder amplio y suficiente para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial a, cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante autoridades o personas del orden administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección y bajo mi (nuestra) expresa(s) instrucción(es), cancelación voluntaria, defensa y presentación de oposiciones, cancelaciones, nulidades, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 25th day of July, 2008

Gale F. Matthews
Assistant Secretary

Signature of the person issuing the Power

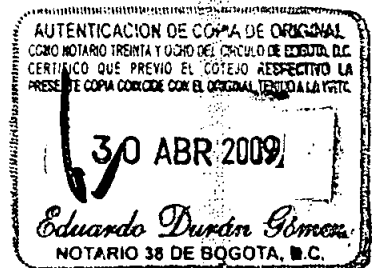
Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 25 días del mes de julio de 2008

Gale F. Matthews
Subsecretario

Firma de la persona que firma el Poder



248

NOTARIAL CERTIFICATIONOn this 25th day of July

2008, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Gale F. Matthews

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

*Assistant Secretary*of the judicial person **WYETH**4. That the judicial person **WYETH** having its home office inFive Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on May 24, 2008.

CERTIFICACION NOTARIALA los 25 días del mes de julio

de 2008, el suscrito Notario

DA FE

1 Que Gale F. Matthews

suscrió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

*Subsecretario*de la persona jurídica **WYETH**4 Que la persona jurídica **WYETH** con sede enFive Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

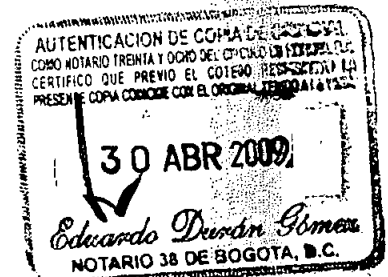
5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de la Junta Directiva celebrada el 24 de mayo de 2008.

Michelle L. McOowan
Notary PublicMICHELLE L. McOOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

El Notario Público



249

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0269/2009 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del traductor. Esta es una traducción oficial efectuada el día 27 de abril de 2009 por la señora Teresa Jiménez de Montes, con cc 41.569.149 de Bogotá, traductora oficial según Resolución N° 220 del 6 de febrero de 1978, expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

AM102577

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada de Solicitudes Internacionales, Wyeth, por el presente certifico que he comparado la copia adjunta con la Cesión Original (para U.S.S.N 60/858,289, y cualquier equivalente legal de la misma en un país del exterior, para la invención titulada : (MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO DE CÉLULAS de fecha enero 2 de 2007 de Yen-Tung Luan, Wenge Wang, Ryan Nolan y Denis Drapeau a Wyeth y que dicha copia es una copia fiel del original.

Dado hoy 2 de abril de 2009, en Madison, New Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

Firmado,

Michelle L. McGowan

Michelle L. McGowan

Asociada Solicitudes Internacionales

PARA USO EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

Estado de New Jersey)

Condado de Morris)

Hoy 2 de abril de 2009, ante mi compareció personalmente Michelle L. McGowan, Asociada Presentaciones Internacionales de Wyeth, a quien conozco como la persona descrita y quien firmó el anterior documento, y reconoció ante mi que firmó el mismo.

Firmado, Barbara A Kiely

Notaria Pública

250

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notaria Público de New Jersey
Mi comisión vence el 20 de junio de 2009.

Expediente No: AM102577
Patente

Cesión de Invención

Como contraprestación válida y suficiente efectuada por el
CESIONARIO al CEDENTE , cuyo recibo se acusa mediante el presente
documento,

EL CEDENTE:

- (1) Nombre completo del inventor: Yen-Tung LUAN
Residencia: 3 Armand Drive. Chelmsford, MA 01824
Nacionalidad: Estados Unidos de América

- (2) Nombre completo del inventor: Wenge WANG
Residencia: 1 Hollow Ridge Road, North Chelmsford, MA 01863
Nacionalidad: China

- (3) Nombre completo del inventor: Ryan NOLAN
Residencia: 71 Montvale Avenue, Apt.5, Stoneham, MA 02180
Nacionalidad: Estados Unidos de América

- (4) Nombre completo del inventor: Denis DRAPEAU
Residencia: 55 Old Farm Road, Salem, NH 03079
Nacionalidad: Estados Unidos de América

por el presente, cede y transfiere al CESIONARIO

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

29

Expediente No: AM102577
Patente

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales del CESIONARIO la totalidad de sus derechos, títulos y participación para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países del exterior, incluyendo todos los derechos a reivindicar antigüedad en y para el invento titulado:

MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO DE CÉLULAS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, si
hubiere alguno:

invención que se encuentra en la **Solicitud Provisional U.S. No. 60/858,289**
presentada el **8 de noviembre de 2006**.

☒ Yo/nosotros el/los CEDENTE (s) que firmamos a continuación , por el presente autorizamos y solicitamos insertar arriba del número de solicitud y fecha de presentación cuando se conozca ,

[marcar también si se está(n) cediendo también la(s) solicitud (es) del exterior]

☒ y cualquier equivalente legal de la solicitud en un país del exterior.

Assignment(Cambridge) NewApp-Provisional.dot-Rev 8/06 Página 1 de 4 Cesión de Invención Solicitud Provisional

incluyendo el derecho a reclamar antigüedad y todas y cualquiera de las mejoras allí reveladas, y con respecto a todos los Títulos de Privilegio que se obtendrán para dicha invención mediante la solicitud antes mencionada o cualquier presentación posterior , provisional, no provisional, continuación, división, renovación o substitución de la misma, y con respecto a la re-expedición o re-reexaminación de cualquier Título de Privilegio relacionado con lo anterior.

EL CEDENTE por el presente acuerda que ninguna cesión, venta, acuerdo o afectación ha sido o será hecho o celebrado que pudiere entrar en conflicto con esta cesión.

EL CEDENTE autoriza al CESIONARIO para que presente las solicitudes y recibir el registro de patente para la invención mencionada en cualquiera de esos países a su nombre, o a nombre del CESIONARIO, a su elección.

252

Expediente No: AM102577

Patente

EL CEDENTE acepta y acuerda firmar o suministrar cualquier garantía adicional necesaria sobre la propiedad de dicha invención y cualquier registro de patente que pueda expedirse, en cualquier momento a solicitud y por cuenta del CESIONARIO dar testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso pertinente y a firmar todos los documentos que puedan ser necesarios o deseables para perfeccionar la propiedad de dicho invento o de cualquier Registro de Patentes que pueda ser otorgado al CESIONARIO, sus sucesores, sucesores a título particular u otros representantes legales, y en cualquier momento , a solicitud y por cuenta del CESIONARIO a firmar cualquier continuación, continuación en parte, división, renovación o sustitución de la misma, y con respecto al Registro de Patentes y a re-expedir o re-examinar las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Registro de Patentes para dicha invención o cualquier parte de la misma, solicitudes y Registros de Patentes que se ceden en su totalidad al CESIONARIO, y presentará los juramentos o declaraciones y realizará los actos legales que se requieran para obtener los mismos, sin ninguna compensación adicional, sino por cuenta del CESIONARIO, sus sucesores, sucesores a título particular y otros representantes legales.

EL CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes para que expida los Registros de Patente de los Estados Unidos para el mencionado invento, que surjan de cualquiera de las solicitudes antes mencionadas a su CESIONARIO.

Firmado (Ilegible)
Yen-Tung LUAN

Enero 2, 2007
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts}
Condado de Essex }

Hoy 2 de enero de 2007 Yen-Tung LUAN compareció personalmente ante mí, quien demostró con evidencia de identidad satisfactoria Licencia de Conducción de Massachusetts ser la persona descrita y quien firmó el documento que antecede y reconoció que firmó el mismo como un acto de su libre voluntad para los efectos indicados.

Firmado, [Ilegible]
Notario Público

Diane R. Driscoll
Notaria Pública
Estado de Massachusetts
Mi comisión vence
Mayo 21, 2010


TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA

253

Expediente No. AM102577
Patente

Firmado,
Wenge WANG

Enero 2, 2007
Fecha

Estado de Massachusetts}
Condado de Essex }

Hoy 2 de enero de 2007 Wenge WANG compareció personalmente ante mi, quien demostró con evidencia de identidad satisfactoria Licencia de Conducción de Massachusetts ser la persona descrita y quien firmó el documento que antecede y reconoció que firmó el mismo como un acto de su libre voluntad para los efectos indicados.

Firmado, [Ilegible]
Notario Público

Diane R. Driscoll
Notaria Pública
Estado de Massachusetts
Mi comisión vence
Mayo 21, 2010

Firmado [firma ilegible]
Ryan NOLAN

Enero 2, 2007
Fecha

Estado de Massachusetts}
Condado de Essex }

Hoy 2 de enero de 2007 RYAN NOLAN compareció personalmente ante mi, quien demostró con evidencia de identidad satisfactoria Licencia de Conducción de Massachusetts ser la persona descrita y quien firmó el documento que antecede y reconoció que firmó el mismo como un acto de su libre voluntad para los efectos indicados.

Firmado, [Ilegible]
Notario Público

Diane R. Driscoll
Notaria Pública
Estado de Massachusetts
Mi comisión vence
Mayo 21, 2010

Firmado [firma ilegible]
Denis DRAMEAU

Enero 2, 2007
Fecha

254

Expediente No: AM102577

Patente

Estado de Massachusetts}
Condado de Essex }

Hoy 2 de enero de 2007 DENIS DRAMEAU compareció personalmente ante mi, quien demostró con evidencia de identidad satisfactoria Licencia de Conducción de Massachusetts ser la persona descrita y quien firmó el documento que antecede y reconoció que firmó el mismo como un acto de su libre voluntad para los efectos indicados.

Firmado, [Ilegible]
Notario Público

Diane R. Driscoll
Notaria Pública
Estado de Massachusetts
Mi comisión vence
Mayo 21, 2010

Assignment(Cambridge) NewApp-Provisional.dot-Rev 8/06 Página 4 de 4 Cesión de Invención Solicitud Provisional

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1. PAÍS | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA |
| 2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO FUE FIRMADO POR | BARBARA A KIELY |
| 3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE | NOTARIA PÚBLICA DE NEW JERSEY |
| 4. LLEVA EL SELLO /ESTAMPILLA DE | BARBARA A KIELY, NOTARIA |

CERTIFICADO

- | | |
|---------------------|---|
| 5. EN | TRENTON, NEW JERSEY |
| 6. EL | 8 DE ABRIL DE 2009 |
| 7. POR | R. David Rousseau, TESORERO DE NEW JERSEY |
| 8. NÚMERO | A359812 |
| 9. SELLO/ESTAMPILLA | SELLO MAYOR DEL ESTADO DE NEW JERSEY |
| 10. FIRMA | Firma Ilegible |
- Certificado Numero: 114105288
Verifique este certificado en línea En
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

259

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

TERESA J. DE MONTES
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 220 MINJUSTICIA


Teresa Jiménez de Montes
c.c. 41.569.149 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No.220 de febrero 6 de
1978 expedida
por el
Ministerio de Justicia.

original
296

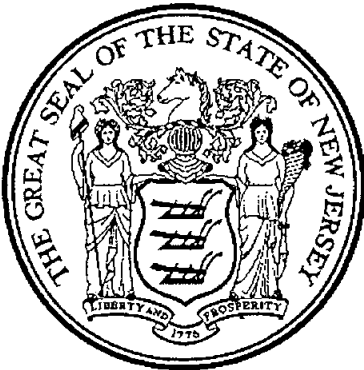
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 8TH DAY OF APRIL 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A359812
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE





Certificate Number: 114105288

Verify this certificate online at

https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

257

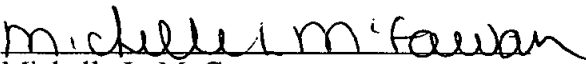
AM102577

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, International Filing Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/858,289, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "RATIONALLY DESIGNED MEDIA FOR CELL CULTURE") dated January 2, 2007 from Yen-Tung Luan, Wenge Wang, Ryan Nolan and Denis Drapeau to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 2nd day of April, 2009, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth



Michelle L. McGowan

International Filing Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

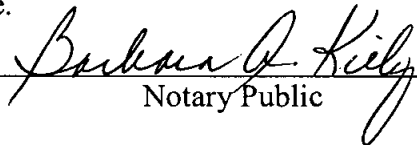
ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)

)

County of Morris)

On this 2nd day of April, 2009, before me personally appeared Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.


Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893

Notary Public of New Jersey

My Commission Expires June 20, 2009

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: Yen-Tung LUAN
Residence: 3 Armand Drive, Chelmsford, MA 01824
Citizenship: United States of America

- (2) Full Name of Inventor: Wenge WANG
Residence: 1 Hollow Ridge Road, North Chelmsford, MA 01863
Citizenship: China

- (3) Full Name of Inventor: Ryan NOLAN
Residence: 71 Montvale Avenue, Apt. 5, Stoneham, MA 02180
Citizenship: United States of America

- (4) Full Name of Inventor: Denis DRAPEAU
Residence: 55 Old Farm Road, Salem, NH 03079
Citizenship: United States of America

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
RATIONALLY DESIGNED MEDIA FOR CELL CULTURE

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/858,289 filed on: November 8, 2006

- ☒ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

- ☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

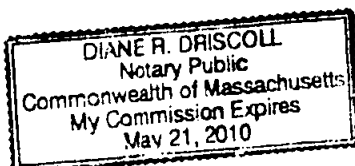
Yen-Tung LUAN
Yen-Tung LUAN

Jan 2, 2007
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts ss:
County of Essex

On the 2nd day of January 2007, before me, personally appeared Yen-Tung LUAN, proved to me through satisfactory evidence of identity which was MA driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/~~she~~ executed the same, of his/~~her~~ own free will and for the purposes set forth.



Diane R. Driscoll
Notary Public

260

Wenge WANG
Wenge WANG

Jan 02, 2007
Date

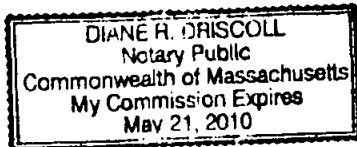
ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts

County of Essex

ss:

On the 2nd day of January 2007, before me, personally appeared Wenge WANG, proved to me through satisfactory evidence of identity which was MA driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that ~~he~~ she executed the same, of his/~~her~~ own free will and for the purposes set forth.



Diane H. Driscoll
Notary Public

Ryan Nolan
Ryan NOLAN

January 2, 2007
Date

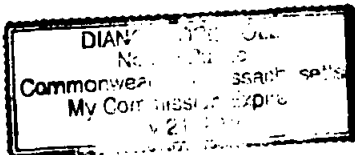
ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts

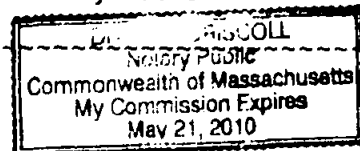
County of Essex

ss:

On the 2nd day of January 2007, before me, personally appeared Ryan NOLAN, proved to me through satisfactory evidence of identity which was MA driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/~~she~~ executed the same, of his/~~her~~ own free will and for the purposes set forth.



Diane H. Driscoll
Notary Public



261

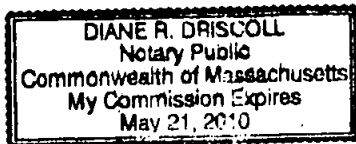
Denis DRAPEAU
Denis DRAPEAU

02 JAN 2007
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts
County of Essex ss:

On the 2nd day of January 2007, before me, personally appeared Denis DRAPEAU, proved to me through satisfactory evidence of identity which was MA driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



Diane R. Driscoll
Notary Public

262

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 5/00	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) WYETH	
(30) Prioridad	(31) No. 60/858,289	32) Fecha 08.11.2006	(33) País US
		(72) Inventor(es) LUAN, Yen-Tung; WANG, Wenge; Y OTROS	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08-05-2009		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 29.05.2008	
Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2007		N° publicación: WO/2008/063892	
No. de solicitud : PCT/US2007/083947			
(54) Titulo: MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO CELULAR			

Reivindicación(es):

- Un método para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:
 - proporcionar un cultivo celular, que comprende:
 - células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y
 - un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés; y
 - mantener el cultivo celular bajo condiciones que permiten expresión del polipéptido de interés.

263



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: C12N 5/00

(51) Clasificación Internacional: C12N 5/00

(71) Solicitante(s) WYETH

(72) Inventor(es) LUAN, Yen-Tung; WANG, Wenge; NOLAN, Ryan; DRAPEAU, Denis

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32)

Fecha

(33) País

60/858,289

08.11.2006

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 08-05-2009

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 29.05.2008

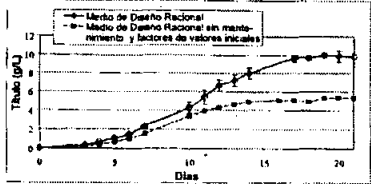
Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2007

N° publicación: WO/2008/063892

No. de solicitud PCT/US2007/083947

(54) Título: MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO CELULAR

264

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION		PCT <u>X</u>	MODELO DE UTILIDAD
DISEÑO INDUSTRIAL			
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:			
(51) Clasificación Internacional : C12N 5/00			
(71) Solicitante(s)) WYETH			
(72) Inventor(es) LUAN, Yen-Tung; WANG, Wenge; NOLAN, Ryan; DRAPEAU, Denis			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/858,289	(32) Fecha 08.11.2006	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-05-2009		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2007 No. de solicitud PCT/US2007/083947		Fecha: 29.05.2008 No. Publicación : WO/2008/063892	
(54) Título: MEDIOS DISEÑADOS RACIONALMENTE PARA CULTIVO CELULAR			
(57) Resumen: Esta invención se relaciona con métodos para diseñar racionalmente medios de cultivo celular para uso en cultivos celulares, por ejemplo, cultivos celulares empleados en producción de polipéptido; medios de cultivo celular diseñados con los métodos descritos; métodos para producir un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, utilizando tales medios; polipéptidos producidos utilizando los métodos y medios descritos aquí; y composiciones farmacéuticas que contienen tales polipéptidos. Los medios diseñados racionalmente contienen una concentración de un aminoácido que se calcula para uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para uso en mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para incorporación en el polipéptido de interés. Los medios diseñados racionalmente pueden contener una concentración ajustada al valor inicial, A, de por lo menos un aminoácido que se calcula de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en donde X es la concentración del aminoácido que se utiliza por unidad de masa celular, P es la concentración del aminoácido que se utiliza para incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es el multiplicador para la densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es el multiplicador para la concentración del polipéptido deseada de interés, Y es el factor de mantenimiento celular; y F es el factor de valor inicial. También se pueden utilizar estos medios diseñados racionalmente para producir un medio de cultivo celular de partida que comprende una concentración, B, de por lo menos un aminoácido de acuerdo con la fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, en donde Z es una concentración del aminoácido en el medio de cultivo celular de alimentación, y V es un volumen del medio de cultivo de alimentación como una proporción del volumen medio de cultivo celular deseado.			

265

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

2009/004

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 18,512
FECHA : MARZO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	M. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	14472172	06/03/2009	75,329,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

200

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

2009/004

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 18,435
FECHA : MARZO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	14472172	06/03/2009	75,329,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR
			273,000.00
TOTAL :			\$ 273,000.00

SON: DOSCIENTOS SETENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

267

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

2009/004

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 18,436
FECHA : MARZO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-045869-00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	14472172	06/03/2009	75,329,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR
			TOTAL : \$ 273,000.00

SON: DOSCIENTOS SETENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

2009/004

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 18,618

FECHA : MARZO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACION:

Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	14472172	06/03/2009	75,329,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL :
			200,000.00
			200,000.00

SDN: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

269

2008/023

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 100,308
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	120646805	24/12/2008	46,377,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	4,000.00
		TOTAL :	\$ 4,000.00

SON: CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

220

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-045869- -00000-0000

Fecha: 2009-05-06 17:13:30 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	☒	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	☒	()
-Descripción de la invención.	☒	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	☒	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	☒	()
COMPLETA ☒ INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:

Edgar Navarro

Fecha:

Mayo 109

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 271

020
Bogotá D.C.,

Autor(a)
ORREA ORDOÑEZ ALVARO
poderado(a) y/o Representante de
YETH

REFERENCIA	Radicación No.	9 45869
	Solicitud internacional	PCT/US2007/083947
	Fecha inicio fase nacional	08/06/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	8635
	Folios	1

Entendiéndose en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Úmplase
Bogotá DC,

28 AGO. 2009

LIX CARMENZA GONZALEZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

Fernand