

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 13025488

Asunto: Solicitud de patente para: *"Método para producir el factor von Willebrand (vWF) de alto peso molecular recombinante en cultivo celular"*.

Solicitante: **BAXTER HEALTHCARE S.A.; BAXTER INTERNATIONAL INC.**

Fecha de solicitud: Febrero 7, 2013

RESPUESTA A PRIMER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 5827, notificado por fijación en lista el 24 de Mayo de 2016.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO

En respuesta al examen de patentabilidad el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 50 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

1. Se ha modificado expresión “composición” de la reivindicación 1 para “proteína”.
2. Se modificaron las reivindicaciones 39 a 41 con la expresión “proteína” para así coincidir con la nueva reivindicación independiente 1.

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

A pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud

II. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

1. Con respecto a la objeción del examinador en contra de la antigua reivindicación 1 según la cual la expresión *“método para producir una composición del Factor von Willerbrand recombinante...”* no existe sustento en el capítulo reivindicatorio para un método para producir una composición, se desea señalar que dicha expresión fue eliminada del pliego reivindicatorio mediante la adición de un nuevo preámbulo “Un método para producir una proteína del Factor Von Willebrand recombinante”. De esta manera, existe ahora únicamente sustento para un método para producir dicha proteína. Teniendo en cuenta lo anterior, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.
2. Con respecto a la objeción del examinador en contra del paso (d) de la reivindicación 1 según la cual las expresión *“el cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 10mM de MH_4^+ ”* corresponde a un resultado a alcanzar, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo debido a que dicha concentración de NH_4^+ es controlada a partir de las características técnicas propias del cultivo, está debidamente soportada en la descripción y de ningún modo puede ser considerada una característica ambigua, sino por el contrario, tratándose de una concentración, es perfectamente distinguible y no se requiere definir otros componentes como la tasa de dilución o perfusión del cultivo continuo y la densidad celular del cultivo. Teniendo en cuenta lo anterior, debe entenderse que la característica en relación al paso del método de cultivar continuamente una o más células en el medio de cultivo, en donde el

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8860 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 60 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 10 mM es una característica medible y válida para caracterizar el método para producir una proteína del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) reclamado. Por lo tanto, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

3. De igual forma, frente a la objeción del examinador en contra del paso (e) de la reivindicación 1 según la cual la expresión *“en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de la menos 30 mU/μg del rVWF”* corresponde a resultado a alcanzar, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo debido a que recuperar al menos una porción del sobrenadante del cultivo, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de la menos 30 mU/μg del rVWF de ningún modo puede ser considerada una característica ambigua, sino por el contrario, tratándose de un material, es perfectamente distinguible. En consecuencia, las condiciones del cultivo deben tomarse como características capaces de definir una invención. Teniendo en cuenta lo anterior, debe entenderse que la característica en relación al paso (e) del método que comprende la etapa de recuperar al menos una porción del sobrenadante del cultivo es una característica medible y válida para caracterizar el método para producir una proteína del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) reclamado. Por lo tanto, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

4. Es preciso aclarar que los fragmentos objetados por definir resultados a alcanzar, ventajas o usos que pueden dársele a la invención, no corresponden a resultados, ventajas ni usos, sino a características técnicas funcionales de la invención, que en este caso se hacen indispensables para que un técnico medio pueda entender a cabalidad la invención y pueda determinar adecuadamente la configuración entre los elementos para que la invención funcione correctamente; lo anterior para garantizar que una persona normalmente versada en la materia pueda reproducir la invención. Con respecto a lo anterior, la “GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD” de su Despacho enuncia:

“Las características técnicas funcionales son los elementos que conforman las invenciones, descritos en términos de su uso o su función. No definen la invención, pero explican la relación que hay entre sus diversas características estructurales (...) Las reivindicaciones deben incluir características estructurales y funcionales cuando para la persona del oficio normalmente

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

versada en la materia no sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos” (Subraya incluida en el texto).

5. De acuerdo con lo anterior, los fragmentos objetados no solo pueden, sino que deben estar en las reivindicaciones, ya que resultan esenciales para que una persona del oficio normalmente versada en la materia entienda correctamente el funcionamiento de la invención.

III. ESTADO DE LA TÉCNICA

Su despacho determinó dos documentos como relevantes para realizar el análisis de patentabilidad de la presente patente de invención:

1. D1, referido al documento **WO 2009086309** titulado “*Cell culture processes*” que divulga un cultivo de células CHO o BHK secretoras de proteínas Factor VIII, ADAMTS-13, furina o Factor VII.

2. D2, referido al documento **WO 2009088713** titulado “*Substantially animal protein-free recombinant furin and methods for producing same*” que divulga métodos para producir furina recombinante.

IV. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NIVEL INVENTIVO

1. En primer lugar, el examinador establece que D1 no menciona específicamente que el contenido de amonio (NH_4^+) es mantenido preferiblemente a una concentración por debajo de 4 mM. Sin embargo, D1, de hecho enseña amoniaco (NH_3). El Amonio y el Amoniaco son dos entidades químicas distintas con diferentes propiedades físicas y químicas. Como referencia tal que enseña amoníaco (como D1) no enseña o sugiere nada con respecto al amonio reivindicado en la presente solicitud. A este respecto, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se objeta el nivel inventivo, con base en la siguiente información:

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8660 - Fax in U.S.A: (1-305) 676 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6728 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

2. Estos dos compuestos son diferentes y la evidencia de las diferencias entre estos dos compuestos se puede encontrar en Schneider et al. y Martinelle et al. Dichas diferencias son importantes para los aspectos técnicos de las reivindicaciones como lo son las características físicas y químicas de amoníaco y amonio. Las características físicas facilitan la difusión a través de membranas celulares y las características químicas compiten con otros cationes para el transporte activo a través de proteínas transportadoras. La evidencia adicional de los efectos diferenciales se proporcionan en Martinelle et al, el cual establece que:

2.1. Se presenta un modelo para el transporte de iones de amoníaco y de amonio a través de las membranas celulares. El modelo sugiere que los iones de amonio compiten con los iones de potasio para el interior de transporte, sobre la membrana citoplasmática, a través de las proteínas de transporte de potasio como el Na^+/K^+ -ATPasa y el cotransportador de $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$.

2.2. Adicionalmente, en la Página 339, la Figura 1 proporciona diferencias adicionales entre el amoníaco (NH_3) y amonio (NH_4^+) en donde: NH_3 se difunde fácilmente a través de las membranas celulares (difusión simple, Tabla 1). Por lo tanto, se establecen fácilmente equilibrios de NH_3 a través de las membranas. La difusión simple de NH_4^+ a través de las membranas celulares es extremadamente lenta (debido a la carga, ver Tabla 1), como es la difusión de otros iones. Asimismo, NH_4^+ puede ser transportado en la célula por ciertas proteínas de transporte.

2.3. En las páginas 340 a 341, las diferencias entre el amonio y el amoníaco no son superficiales, pero tienen consecuencias potencialmente importantes con respecto a los mecanismos celulares. Con base en lo anterior, mi representada señala que la reivindicación 1 presentada en el nuevo pliego reivindicatorio establece que el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo de células se mantiene a una concentración por debajo de 10 mM.

3. Por otro lado, Schneider et al. no enseña o sugiere nada con respecto a mantener la concentración de amonio en o por debajo de cierto nivel, y no enseña o sugiere nada con respecto a rvWF o actividad rvWF . Es importante destacar que, mantener la concentración de amonio por debajo de un nivel particular es un elemento activo que es parte de la etapa de cultivo en el método reivindicado. Asimismo, mantener el contenido de amonio no es simplemente una función pasiva de otros elementos del método. Por lo tanto, la presente invención proporciona dos referencias ejemplares que muestran que los métodos de cultivo de

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

células que incluyen medidas activas para la eliminación de amonio a partir de sobrenadantes de cultivo de células se conocen en la técnica en la fecha de prioridad de la presente solicitud Jeong et al. y Altamirano et al:

3.1. Jeong et al. describe el uso de adsorbentes para la eliminación in situ de amonio a partir de medios de cultivo celular (ver Resumen y las Figuras 3 a 5).

3.2. Altamirano et al. describe experimentos para reducir la generación de amonio por el cambio de las fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo celular (ver Conclusión y páginas 72 a 74, especialmente Figuras 1F y 3).

3.3. Estas referencias muestran que mantener las concentraciones de amonio en un nivel especificado es un paso activo en los métodos de cultivo de células. Por lo tanto, el elemento de las presentes reivindicaciones que indican que el contenido de amonio del sobrenadante de cultivo de células está en una concentración inferior a 10 mM es un paso activo e inventivo de las presentes reivindicaciones. Por lo tanto, D1 no enseña ni sugiere este paso activo y, como tal, no enseña ni sugiere resolver el problema técnico objetivo propuesto por las reivindicaciones de la presente solicitud.

3.4. Por otra parte, estas referencias muestran que existe una correlación entre la presencia de la concentración alta de amonio y una pérdida de la producción de proteínas. Específicamente, Jeong et al. muestra que los metabolitos tales como amonio, inhibe el crecimiento celular y la formación de producto (ver el primer párrafo de introducción y de las figuras 1 y 2). Del mismo modo, Altamirano et al. analizan los efectos inhibitorios de iones de amonio (ver la Introducción).

4. Además, D1 no enseña o sugiere ninguna concentración de amonio específica ya que solo divulga amoníaco una sola vez en la página 12. Como tal, D1 no enseña ni sugiere que el contenido de amonio del sobrenadante de cultivo de células esté en una concentración por debajo de 10 mM como lo divulga la reivindicación 1 de la presente solicitud, ni a una concentración por debajo de 4 mM como lo divulga la reivindicación 2 de la presente solicitud.

4.1. Adicionalmente y como se indicó anteriormente, D1 sólo menciona el amoníaco una sola vez en la página 12 y el amoníaco es un compuesto químico diferente con propiedades diferentes a las del amonio. Además, D1 no enseña o sugiere nada con respecto a cuánto

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

tiempo se mantiene la concentración de amoníaco y no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia en absoluto con respecto a la de amonio, ya que es un compuesto químico diferente que el amoníaco. Mantener el contenido de amonio del sobrenadante del cultivo celular a una concentración por debajo de 10 mM es un paso activo, empleado con el fin de obtener el rvWF con la actividad específica reivindicada de al menos 30 mU / mg rvWF. La reivindicación independiente 1 del nuevo pliego reivindicatorio describe una combinación inventiva de las características que D1 no enseña ni sugiere.

5. De igual forma, respetuosamente señalamos las deficiencias del análisis inventivo por parte del examinador frente a D2, ya que esta tampoco proporciona semejanza alguna con el método de la presente solicitud por las siguientes razones:

5.1. Mi representada señala que la característica inventiva de las reivindicaciones presentadas en el nuevo pliego reivindicatorio es el conjunto de pasos del método reivindicado, incluyendo mantener la cultura de sobrenadante por debajo de una concentración de 10 mM NH₄⁺, que conduce al nivel determinado de actividad del cofactor ristocetina de al menos 30 mU/microgramo. Como se discutió anteriormente, D1 no proporciona estos elementos.

5.2. Asimismo, con respecto a D2, simplemente no hay enseñanza o sugerencia alguna que conduzca al experto en la técnica mantener la concentración de cobre de al menos 2,4 g/L y la concentración de amonio del sobrenadante del cultivo celular por debajo de 10 mM para alcanzar tan alta actividad del cofactor ristocetina rvWF. A lo sumo, D2 menciona amonio una sola vez en el contexto general de una condición de medio que se puede supervisar durante el cultivo celular, junto con la glucosa, lactato y pH (véase el párrafo [0105]). D2 también menciona el cobre solamente una vez como parte de una larga lista de metales de transición a modo de ejemplo que podrían añadirse al medio de cultivo celular, pero el cobre no se menciona en el contexto de cualquier concentración particular o para mantener esa concentración.

6. Por lo tanto, mi representada respetuosamente señala que ninguno de los documentos citados del arte previo describen o sugieren un método para producir una proteína recombinante del factor von Willebrand (rvWF) y/o la composición que implica mantener el contenido de amonio de un sobrenadante de cultivo a una concentración por debajo de 4 mM o 10 mM, sola o en cualquier combinación.

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3811 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

6.1. Adicionalmente, mi representada sostiene que mantener la concentración de amonio en los niveles divulgados en la presente solicitud, resulta en la producción mejorada de rvWF como se describe en el capítulo descriptivo de la presente solicitud.

6.2. Mi representada reitera que el método para producir una proteína del Factor Von Willebrand recombinante proporciona una característica técnica inventiva que los documentos citados por el examinador no dan a conocer ni sugieren la solución a un problema de producir rvWF con un alto nivel de actividad como se divulga en el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud.

7. Como consecuencia de lo anterior, la reivindicación independiente 1 es inventiva sobre el estado del arte citado. Consecuentemente, las reivindicaciones 2 a 50 son también inventivas en virtud de su dependencia de la reivindicación 1.

VI. ANEXOS

1. Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 50 reivindicaciones

2. Evidencia técnica suministrada por el cliente:

2.1. Martinelle, Kristina, and Lena Häggström. "Mechanisms of Ammonia and Ammonium Ion Toxicity in Animal Cells: Transport across Cell Membranes." *Journal of Biotechnology* 30.3 (1993): 339-50. Web.

2.2. Jeong, Yeon-Ho, and Shaw S. Wang. "In Situ Removal of Ammonium Ions from Hybridoma Cell Culture Media: Selection of Adsorbent." *Biotechnol Tech Biotechnology Techniques* 6.4 (1992): 341-46. Web.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

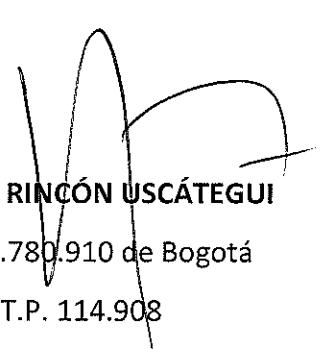
BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A: (1-306) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

V. PETICIÓN

Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

Señor Director,



ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

COLO-13936-0841-0051-6
JBN\JBN\ID-290063\WPC13936
No. M-2016-290063\JBN

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A: (1-305) 875 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el método comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales;
 - (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2.4 µg/L;
 - (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rVWF;
 - (d) cultivar continuamente una o más células en el medio de cultivo de células suplementadas con cobre de manera que el rVWF se expresa y excreta de las células en un sobrenadante del cultivo de en donde el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 10 mM, en donde la concentración de NH_4^+ es mantenida por al menos 7 días de cultivación continua de la una o más células; y
 - (e) recuperar al menos una porción del sobrenadante del cultivo, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/µg del rVWF.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende la etapa de suplementar el medio de cultivo de células basales con un hidrolizado previo a cultivar una o más células.
3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado de planta.
4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado de soya.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína animal.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado

porque el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre químicamente definido.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es al menos 4 µg/L de cobre.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es entre 2.4 µg/L y 20 µg/L de cobre.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales suplementado con cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste de sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque una o más células son células de mamífero.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque las células de mamífero son células CHO.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque cultivar una o más células comprende cultivación por lotes de las células.

15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la cultivación continua de células se realiza en modo quimiostático.

16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la cultivación continua de células se realiza en modo de perfusión.

17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque una o más células se cultivan en al menos 100 L del medio de cultivo suplementado a

base de células basales.

18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 2.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 2.0×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

20. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 1.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque la etapa de recuperar al menos una porción del sobrenadante del cultivo comprende filtración o centrifugación para remover las células de la porción del sobrenadante del cultivo.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 40 mU/ μ g del rVWF.

23. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF.

24. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 60 mU/ μ g del rVWF.

25. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

26. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de

al menos 80 mU/ μ g del rVWF.

27. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, caracterizado porque al menos 10% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

28. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, caracterizado porque al menos 20% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

29. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, caracterizado porque al menos 30% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

30. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, caracterizado porque el sobrenadante contiene multímero del VWF de alto peso molecular de 14 a 22 dímeros.

31. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM

32. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado porque el rVWF es co-expresado con el Factor VIII recombinante (rFVIII).

33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque además comprende una etapa de purificación del rVWF lejos de al menos 50% del rFVIII presente en el sobrenadante recuperado.

34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la relación del rVWF a rFVIII después de la etapa de purificación es al menos 10:1.

35. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado porque el método además comprende una etapa de enriquecimiento del rVWF.

36. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el sobrenadante se prepara por un método de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

37. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque al menos 20% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

38. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el sobrenadante contiene al menos 0.5 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL.

39. Una proteína del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) caracterizada porque se prepara por un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

40. La proteína de conformidad con la reivindicación 39, en donde la proteína es parte de una composición, en donde dicha composición además comprende el Factor VIII recombinante (rFVIII).

41. La proteína de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque la relación del rVWF a rFVIII es al menos 10:1.

42. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la concentración de NH_4^+ es mantenida por al menos 14 días de cultivación continua de la una o más células.

43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la concentración de NH_4^+ es mantenida por al menos 21 días de cultivación continua de la una o más células.

44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la concentración de NH_4^+ es mantenida por al menos 28 días de cultivación continua de la una o más células.

45. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde la concentración de NH_4^+ es mantenida por 5 semanas de cultivación continua de la una o más células

46. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, en donde el contenido de NH_4^+ del sobrenadante del cultivo celular es mantenido a una concentración menor a 4 mM.
47. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 46, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/ μg del rVWF después de al menos 7 días de cultivación continua de la una o más células.
48. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 46, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/ μg del rVWF después de al menos 14 días de cultivación continua de la una o más células.
49. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 46, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/ μg del rVWF después de al menos 28 días de cultivación continua de la una o más células.
50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 46, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/ μg del rVWF después de al menos 5 semanas de cultivación continua de la una o más células.

COLO-13936-0841-0051-6
JBN\JBN\ID-290064\WPC13936
No. M-2016-290064\JBN

BIOTEC 00914

Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes

Kristina Martinelle and Lena Häggström

Department of Biochemistry and Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

(Received 2 November 1992; revision accepted 27 January 1993)

Summary

A model for transport of ammonia and ammonium ions across cell membranes is presented. The model suggests that ammonium ions compete with potassium ions for inward transport, over the cytoplasmic membrane, via potassium transport proteins like the Na^+/K^+ -ATPase and the $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -cotransporter. It also explains the difference between the ammonia/ammonium that is added to the cells and which is formed by the cells during metabolism of amino acids, especially glutamine and glutamate. The ammonium transport and subsequent events lead to predictable intracellular and extracellular pH (pH_e) changes. Experiments which verified the model and the predicted consequences were performed by measurements of the pH_e in concentrated cell suspensions. Addition of ammonium ions caused a time-dependent pH_e increase which was inhibited by potassium ions. The test system is not per se specific for transport measurements but the effect of potassium ions on the pH_e strongly favors our suggested model. Simple diffusion of ammonium ions would not be counteracted by potassium ions. The results show that ammonium ion transport in the murine myeloma cell line (Sp2/0-Ag14) used is inhibited by an excess of potassium ions. Results from experiments with specific inhibitors of suggested transport proteins were not conclusive. It is postulated that one important toxic effect of ammonia/ammonium is an increased demand for maintenance energy, caused by the need to maintain ion gradients over the

Correspondence to: Lena Häggström, Department of Biochemistry and Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-100 44 Stockholm, Sweden.

cytoplasmic membrane. The results also suggest that potassium ions can be used to detoxify ammonia/ammonium in animal cell cultivations.

Myeloma cells; Ammonium transport; Ammonia toxicity; Ammonium toxicity; Potassium ions; Bioreactor control

Introduction

Ammonia and ammonium ions are toxic to animal cells – different growth inhibiting concentrations being reported for different cell lines (Glacken et al., 1986; Miller et al., 1988; Ozturk et al., 1992; Reuveny et al., 1986). The problem with $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ accumulation in cell cultures has been addressed by many workers (e.g. Glacken, 1988; Glacken et al., 1988; Ljunggren and Häggström, 1990, 1992; Miller et al., 1988) and the following mechanisms of toxicity is proposed: Disturbance of electrochemical gradients (Glacken, 1988), inhibition of enzymatic reactions – e.g. the conversion of glutamate to α -ketoglutarate via glutamate dehydrogenase (Glacken et al., 1988), intracellular pH changes (Glacken, 1988; McQueen and Bailey, 1990a,b, 1991) which may lead to disturbance of proton gradients and inhibition of endocytosis and exocytosis (Docherty and Snider, 1991) and an increased demand for maintenance energy (this article).

Knowledge about the mechanisms of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ toxicity may provide means for developing control strategies in animal cell processes. The aim of this work was therefore to further study some of the toxic mechanisms of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. The traditional way of measuring the inhibitory characteristics of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ is to add an ammonium salt to a cell culture and to follow growth, substrate uptake, product and by-product (e.g. lactic acid and $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) formation. However, it is important to analyse if $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ added to the cells or produced by the cells have the same effect. As a basis for a discussion on $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ toxicity a model describing transport over cell membranes of intracellularly produced and extracellularly added $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ as well as concomitant pH changes is presented. We further present results from experiments designed to test the model.

Model for transport of ammonia and ammonium ions

Figure 1 presents the model: NH_3 diffuses easily through cell membranes (simple diffusion; Table 1). Hence, NH_3 equilibria across membranes are readily established. The equilibrium between NH_3 and NH_4^+ is pH-dependent [$\text{p}K_a = 8.95$ at 35°C , calculated from $\text{p}K_w = 13.6801$ and $\text{p}K_b = 4.7330$ (Handbook of Chemistry and Physics, 1984–1985)]. The concentration of NH_3 in the extracellular bulk liquid determines the concentration of NH_3 in each intracellular compartment. Thus, the pH of a specific cellular compartment governs the total concentration of $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ in that organelle according to $\text{pH} = \text{p}K_a + \log (\{\text{NH}_3\}/\{\text{NH}_4^+\})$.

TABLE 1
Simple diffusion of ammonia and ammonium ions

Compound	Diffusion rate (cm s ⁻¹)	Cell type	Reference
NH ₃	0.01	Human erythrocyte	Knepper et al., 1989
	0.007	MDCK cells	Knepper et al., 1989
	0.006	Squid giant axon	Boron and De Weer, 1976
NH ₄ ⁺	4.9–5 × 10 ⁻⁶ ^a	Turtle bladder	Knepper et al., 1989
	3.5 × 10 ⁻⁷ ^b	Mouse hybridoma	McQueen and Bailey, 1990b
	6.8 × 10 ⁻⁸	Squid giant axon	Boron and De Weer, 1976

^a Simulated value.
^b NH₄⁺ permeability supposed to be the same as the K⁺ permeability.

Simple diffusion of NH₄⁺ through cell membranes is extremely slow (Table 1) – due to the charge – as is the diffusion of other ions. However, NH₄⁺ can be transported into the cell by certain transport proteins (Fig. 1). Possible candidates for inward transport of NH₄⁺ are the Na⁺/K⁺-ATPase (Post and Jolly, 1957) (active transport) and the Na⁺K⁺2Cl⁻-cotransporter (Good et al., 1984; Kikeri et al., 1989; Knepper et al., 1989) (facilitated diffusion). NH₄⁺ is transported into the cell on the binding sites for K⁺, the natural substrate for these proteins, because hydrated NH₄⁺ has the same ionic radius as hydrated K⁺ (Kikeri et al., 1989; Knepper et al., 1989; Lund et al., 1970). The Na⁺/H⁺-exchanger has also been suggested as a possible NH₄⁺ transporter (Grinstein and Rothstein, 1986; Knepper et al., 1989) (facilitated diffusion).

Formation of NH₃/NH₄⁺ by the cells occurs mainly in the mitochondria by the mitochondrial enzymes glutaminase and glutamate dehydrogenase (Kovacevic and McGivan 1983; McKeehan, 1986). These reactions liberate NH₄⁺ which only slightly changes (decreases) the mitochondrial pH as the equilibrium with NH₃ is formed (Fig. 1). The mitochondrial pH is, however, decreased as NH₃ diffuses out

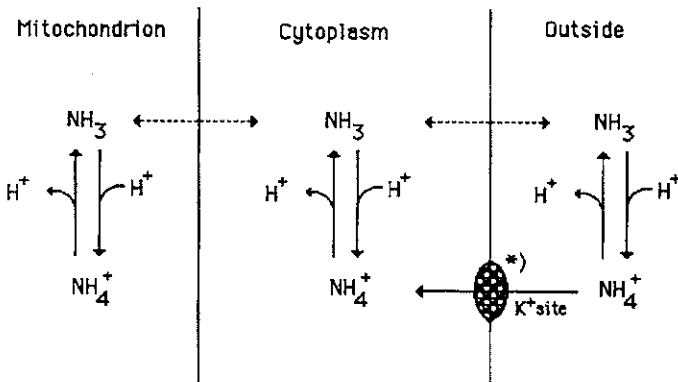


Fig. 1. Model for transport of ammonia and ammonium ions. *) Schematic representation of three possible transport proteins.

to the cytoplasm. The outflow of NH_3 forces formation of new $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ from NH_4^+ to reestablish the equilibrium in the mitochondrion. While NH_3 readily diffuses through the extremely ion impermeable inner mitochondrial membrane and transiently increases the cytoplasmic pH the protons are left behind.

Ammonia that diffuses from the cytoplasm to the outside of the cell can be transported back across the cytoplasmic membrane via certain transport proteins (see above) as NH_4^+ , in competition with K^+ (Fig. 1). The transport can occur against a concentration gradient but intracellularly transported NH_4^+ equilibrates immediately with NH_3 which again diffuses out of the cell. The result of such a futile cycle is a time-dependent acidification of the cytoplasm (protons are left behind, as explained above) and an alkalisation of the outside environment. Thus, mitochondrial formation of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ decreases both the mitochondrial and the cytoplasmic pH – the cytoplasm becoming progressively more acid by time. Other cellular compartments will turn alkaline as NH_3 diffuses into them.

Addition of NH_4^+ to a cell culture transiently increases the cytoplasmic pH and decreases the extracellular pH due to rapid diffusion of NH_3 into the cells. This is followed by an external alkalisation and a cytoplasmic acidification due to transport of NH_4^+ into the cell via the NH_4^+ transporting proteins and subsequent outward diffusion of NH_3 as explained above (Fig. 1). The mitochondrial pH as well as pH in other compartments will increase due to diffusion of NH_3 . Spontaneous decomposition of glutamine in the cultivation medium will have the same effect as added ammonium.

The difference between addition and cellular formation of NH_4^+ is the effect on the mitochondrial pH. Added NH_4^+ increases it while produced NH_4^+ decreases it. In both cases the cytoplasmic pH decreases (Fig. 1). The proton gradient over the mitochondrial membrane could be strengthened by added NH_4^+ but weakened by intracellularly produced NH_4^+ . This likely influences energy formation as mitochondrial ATP production depends on the proton gradient across the inner mitochondrial membrane. Normally the outside is more acidic than the inside. We speculate that the NH_4^+ formed by the cells may be more toxic than the extracellularly added NH_4^+ .

Materials and Methods

Cell line and medium

A murine myeloma cell line (Sp 2/0-Ag14) cultivated in Eagle's MEM with 5.5 mM of glucose, 4 mM of glutamine, 8.9 mM of sodium bicarbonate, 1 mM of sodium pyruvate, 5% FBS (HyClone) and 20 mM HEPES was used. All medium components except for the FBS were from Nord, Junter and Cell, Sweden. The medium pH was adjusted to 7.1–7.2 with 5 M NaOH.

Preparation of cells

Cells were routinely cultured in T-flasks (75 cm²) with 30 ml of medium, at 37°C. To obtain a concentrated cell suspension ($\sim 10^8 \text{ ml}^{-1}$) for the experiments,

1 l shake flasks with 200 ml of medium were seeded with $1.5\text{--}2 \times 10^5$ cells per ml, closed with rubber stoppers and incubated on a shaker (75 rpm) at 37°C for 48 h. The cell suspensions were centrifuged (750 g, 20 min) in a swing-out centrifuge (Wifug Clinic, Wifug) at 4°C and the pellets washed with Dulbecco's PBS (Gibco) without Mg^{2+} and Ca^{2+} and centrifuged (750 g, 15 min) again. The new pellets were suspended in PBS to give a cell density of $\sim 10^8$ viable cells per ml. The cells were counted on a haemocytometer using the trypan blue exclusion method. This cell suspension was used in the experiments below.

pH experiments

The experiments were performed in a 10 ml beaker with a concentrated cell suspension in PBS. One ml cell suspension was added to 9 ml of PBS giving a final cell concentration of $\sim 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Mixing was achieved by a small magnet while the beaker was placed on a magnetic stirrer. The beaker was insulated from the heat generated by the magnetic stirrer to ensure a constant temperature during the experiment. The measurements were performed at room temperature.

The extracellular pH changes following addition of NH_4Cl (Merck), KCl (Merck), ouabain (Boehringer-Mannheim), bumetanide (Sigma) and amiloride (Sigma) were measured each 20 s during 20 min using a combined glass/reference (saturated Ag/AgCl) electrode connected to a three decimal pH meter (PHM84, Radiometer). The final concentration of NH_4Cl was 10 mM. The additional concentration of KCl was 10, 30 or 50 mM – since PBS contains 4.15 mM of KCl this gives a total of 14.15, 34.15 or 54.15 mM. The final concentrations of ouabain, bumetanide and amiloride were 10, 1 and 5 mM, respectively.

For selection of suitable inhibitor concentrations suspensions of cells and inhibitors were incubated in PBS for 20 min at room temperature on a magnetic stirrer. The viability after 20 min (v_{20}) was compared to the starting viability (v_0) to determine the LD_{50} . However, ouabain (0.1–16 mM), 0.1–1 mM of bumetanide or 0.1–1 mM of amiloride did not cause any change in the cell viability during 20 min. At bumetanide concentrations of 5 and 9 mM, v_{20} was 90% and 15% of v_0 , respectively. This decrease in viability could also be due to the decrease in pH caused by bumetanide. At 9 mM of amiloride v_{20} was 95% of v_0 . The applied concentrations of ouabain and amiloride were for practical reasons the maximum obtainable in the complete test system. The applied concentration of bumetanide was restricted by its pH decreasing effect.

The PBS was allowed to equilibrate with air during 20 min on the magnetic stirrer before each experiment. Addition of components to PBS was made in the following order: cells, ouabain/bumetanide/amiloride, KCl and finally NH_4Cl , with 1 min duration between each addition. Appropriate control experiments were performed in parallel to all experiments. No substrate was added to the cells during pH measurements since glucose addition, in early experiments, showed to cause an extensive production of lactic acid which made all other pH changes impossible to measure.

Results

To test the model a series of experiments were designed. According to the model changes in cytoplasmic pH (pH_{cp}), caused by the inward transport of NH_4^+ , should result in opposite extracellular (pH_e) changes. Hence, it should be possible to measure the pH_e and make conclusions about intracellular events. The following experiments were performed:

- (1) Addition of NH_4Cl to a cell suspension. Transport (or simple diffusion) of NH_4^+ into the cells should be observed as a time-dependent increase of pH_e .
- (2) Addition of KCl and NH_4Cl to a cell suspension. If the presence of K^+ could prevent transport of NH_4^+ due to competition for binding to the transport proteins this should be observed as the absence of the pH_e increase.
- (3) Addition of the specific inhibitors ouabain (Na^+/K^+ -ATPase), bumetanide ($\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -cotransporter) or amiloride (Na^+/H^+ -exchanger) and NH_4Cl to a cell suspension. Inhibition of transport of NH_4^+ via the transport proteins should be observed as the absence of the pH_e increase after addition of NH_4^+ to the cells.

(1) NH_4Cl

Addition of NH_4Cl to PBS without cells immediately decreased the pH due to proton release as the equilibrium $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$ was established (Fig. 2). Addition of cells to PBS also decreased pH_e sharply. In both cases pH_e remained stable thereafter (Fig. 2). Upon addition of NH_4Cl to cells, already suspended in PBS, again there was a sharp decrease in pH_e due to the addition of salt, now

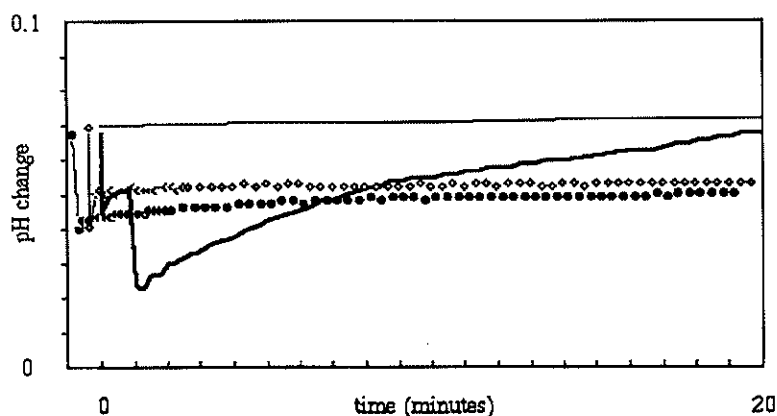


Fig. 2. Addition of NH_4Cl to a cell suspension. The curves are drawn apart at time = 0 minutes for clarity. Symbols: (—) PBS only, ($\diamond$) PBS + cells, ($\bullet$) PBS + NH_4Cl , and ($\blacksquare$) PBS + cells + NH_4Cl .

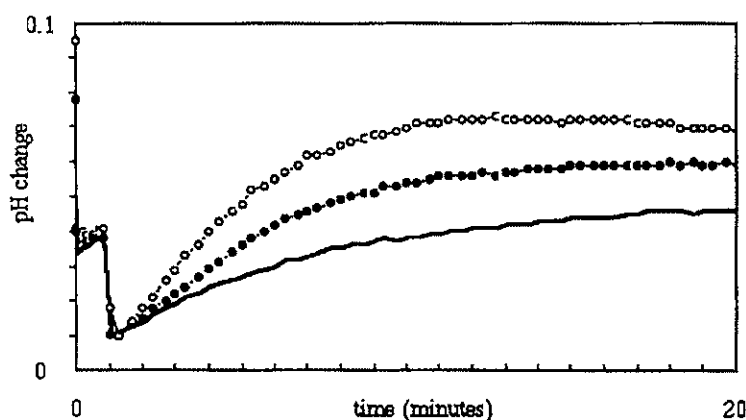


Fig. 3. Influence of cell concentration on the pH_e upon addition of NH_4Cl . Symbols (■) 10^7 ml^{-1} , (●) $2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ and (○) $3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$.

followed by a slow pH_e increase (Fig. 2). The pH_e drop upon addition of NH_4Cl is larger in PBS with cells (0.032 ± 0.0022 pH units, mean value from ten experiments) than in PBS alone (0.024 ± 0.0025 pH units, mean value from ten experiments). This is in agreement with the theory on NH_3 diffusion into cells, leaving protons behind. In samples with double and triple amount of cells the pH_e increase was proportional to the amount of cells (Fig. 3).

(2) NH_4Cl and KCl

If 14.15 mM of KCl was present when NH_4Cl was added the pH_e increase was totally suppressed as compared to a cell suspension with 4.15 mM of KCl (Fig. 4a). No effect could be seen in experiments with 6.65 or 9.15 mM of KCl (data not shown) but 34.15 and 54.15 mM gave the same result as 14.15 mM of KCl (Fig. 4a). All control experiments (PBS alone, PBS + cells and PBS + NH_4^+ in Fig. 2; PBS + K^+ , PBS + cells + K^+ and PBS + K^+ + NH_4^+ in Fig. 4b) showed that pH_e remained stable for the duration of the experiments.

(3) NH_4Cl and ouabain, bumetanide or amiloride

Presence of 10 mM of ouabain or of 5 mM of amiloride in the test system did not influence the pH_e increase after addition of NH_4^+ while the presence of bumetanide or bumetanide + ouabain significantly depressed it as shown in Fig. 5a. Though, the control experiments with bumetanide and bumetanide + ouabain added to a cell suspension caused a fall in the pH_e (Fig. 5b). Because of this pH_e decrease it is not possible to draw any conclusions about the inhibitory effect of bumetanide or ouabain.

Discussion

Figs. 2, 3, 4 and 5 clearly show that a reproducible and time-dependent increase in pH_e occurs after addition of NH_4^+ to a cell suspension. We suggest that this pH_e increase depends on transport of NH_4^+ into the cell and subsequent NH_3 diffusion out of the cell as our model predicts. This conclusion is not immediately evident because our test system is not per se specific for transport measurements. The same result should have been obtained if NH_4^+ entered the cell by simple diffusion. Theoretically it is also possible that other events, not considered here, could give the same result. Though, the inhibition of the pH_e increase by the presence of K^+ strongly favours our suggested model. It appears reasonable to interpret the effect caused by K^+ as competitive inhibition of the transport. Examples of K_m for K^+ transport by the Na^+/K^+ -ATPase are 1.8 mM in crab nerve (Skou, 1960) and 2.1 mM in human erythrocyte (Post et al., 1960). Corresponding K_m for NH_4^+ are 5 mM and 7–16 mM, respectively. Potassium at the applied concentration of 14.15 mM should saturate the binding sites thus preventing transport of NH_4^+ .

Addition and subsequent removal of an ammonium salt solution is an established method of purposely acid loading a cell culture (Aickin and Thomas, 1977; Boron, 1977, 1983). However, the explanations to the mechanism that causes the acidification differ: Aickin and Thomas (1977) suggested active transport of NH_4^+

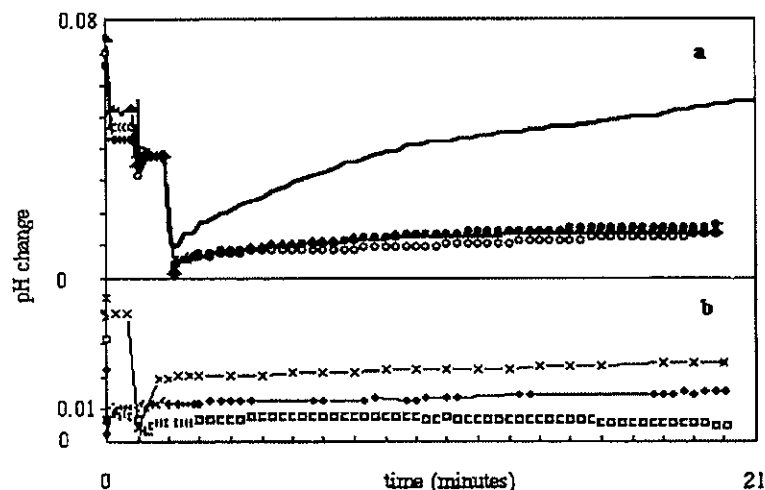


Fig. 4. Addition of KCl and NH_4Cl to a cell suspension. Addition of components to PBS was made in the following order: cells, KCl and NH_4Cl . The sharp pH_e decrease at 2 min (Fig. 4a) represents the addition of NH_4Cl . Symbols in a: (■) PBS+cells+ NH_4Cl , (●) PBS+14.15 mM KCl+ NH_4Cl , (○) PBS+cells+34.15 mM KCl+ NH_4Cl and (▲) PBS+cells+54.15 mM KCl+ NH_4Cl . Symbols in b: (□) PBS+cells+14.15 mM KCl, (◆) PBS+54.15 mM KCl and (×) PBS+14.15 mM KCl+ NH_4Cl .

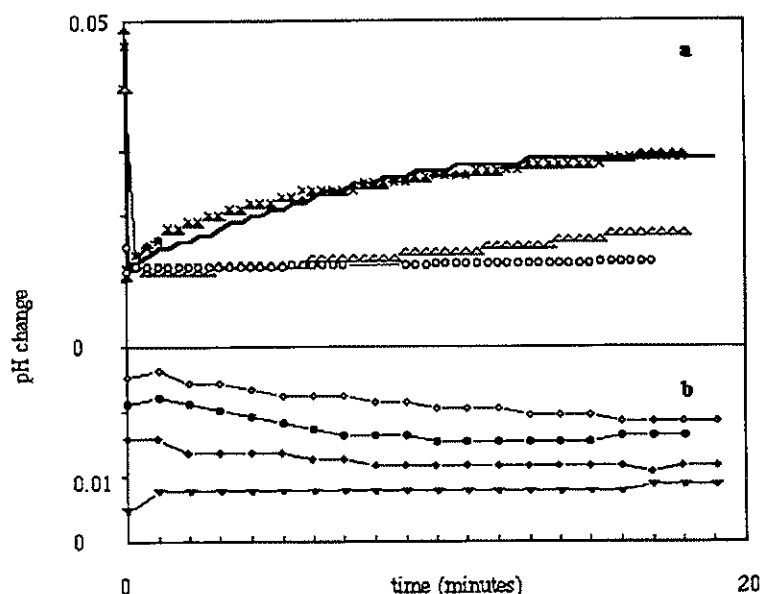


Fig. 5. Addition of specific transport protein inhibitors together with NH_4Cl to a cell suspension. Addition of components to PBS was made in the following order: cells, inhibitor and NH_4Cl . All experiments are shown from the moment when the last addition was made. Symbols in a: (■) PBS+cells+ NH_4Cl , (▲) PBS+cells+ouabain+ NH_4Cl , (×) PBS+cells+amiloride+ NH_4Cl , (Δ), PBS+cells+bumetanide+ NH_4Cl and (○) PBS+cells+ouabain+bumetanide+ NH_4Cl . Symbols in b: (◆) PBS+cells+ouabain, (◇) PBS+cells+bumetanide, (▼) PBS+cells+amiloride and (●) PBS+cells+ouabain+bumetanide.

via the Na^+/K^+ -ATPase while Boron (1977, 1983) suggested simple diffusion of NH_4^+ driven by concentration and electrochemical gradients. Our experimental results are contradictory to the proposal by McQueen and Bailey (1990b, 1991), Boron and De Weer (1976) and Boron (1977, 1983) which implies that NH_4^+ enters the cell by simple diffusion through the plasma membrane. Although we cannot make any conclusions about which proteins are the most important NH_4^+ transporters (see further below) in the cell line applied, simple diffusion of NH_4^+ would not be counteracted by K^+ . The applied concentrations of NH_4^+ and K^+ in the present investigation should be low enough not to disturb the plasma membrane electrochemical potential.

The results from the experiments with specific inhibitors of the transport proteins were not conclusive. Obviously bumetanide causes a decrease in pH_e which makes it impossible to interpret the inhibition of the pH_e increase as inhibition of NH_4^+ transport. A further explanation could be that the applied concentrations of respective inhibitor were too low. The inhibitor concentrations chosen were based on literature data and our own preliminary experiments (see Materials and Methods). Ouabain concentrations of 0.1–0.2, 0.1 and 5 mM have

been reported to inhibit the Na^+/K^+ -ATPase in 3T3 mouse fibroblasts (Rozenfurt and Heppel, 1975), mouse soleus muscle (Aickin and Thomas, 1977) and mouse kidney cells (Kikeri et al., 1989), respectively. Bumetanide concentrations of 0.01 and 1 mM is known to inhibit the $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -cotransporter in human retinal pigment epithelium (Kennedy, 1990) and mouse kidney (Kikeri et al., 1989), respectively. Amiloride concentrations of 0.1, 0.2 and 2 mM is known to inhibit the Na^+/H^+ -exchanger in mouse soleus muscle (Aickin and Thomas, 1977), Ehrlich ascites tumour cells (Livne and Hoffmann, 1990) and mouse proximal tubule (Roos and Boron, 1981), respectively. It is obvious that the inhibitor sensitivity differs widely between cell lines and cell types, e.g. human cells are much more sensitive than murine cells. Still, the concentrations required for total inhibition of the proteins in the murine myeloma cell line used in the present investigation is not known to us. Furthermore, ouabain (at certain concentrations) is used as a selection agent during cell transformation, killing normal cells and leaving transformed cells intact. An obvious experiment, inhibiting all three of the suggested NH_4^+ transporters, was never performed because it was not possible to obtain the necessary concentrations (see Materials and Methods).

Assuming transport of NH_4^+ via transport proteins – what are then the consequences in terms of toxicity for the cell? Firstly, NH_4^+ is transported into the cell instead of K^+ . This may decrease the intracellular K^+ concentration, an important factor for many enzymes and for the potassium gradient over the cytoplasmic membrane. Secondly, it costs energy – at the direct expense of ATP if NH_4^+ goes in on the Na^+/K^+ -ATPase and indirectly if it goes in on the $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -cotransporter. In the latter case the cotransported Na^+ have to be pumped out again to maintain the Na^+ gradient over the cell membrane. This is accomplished by the Na^+/K^+ -ATPase – a process that in turn may accelerate the inward transport of NH_4^+ . Further, in order to counteract the acid load the cell has to pump out protons. This is normally effected by the Na^+/H^+ -exchanger, an enzyme which is activated when cytoplasmic pH falls below its set point (Grinstein and Rothstein, 1986; Gillies and Martinez-Zaguilan, 1991; McQueen and Bailey, 1990b) of approx. pH 7.0 (Livne and Hoffmann, 1990). Again, a requirement for pumping out Na^+ by the Na^+/K^+ -ATPase arises. We therefore suggest that one important toxic mechanism of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ exposure is an increased demand for maintenance energy, caused by the need to keep up ion gradients over the cytoplasmic membrane. This effect should be the same whether NH_4^+ is produced by the cells or added to the culture. Though, it is difficult to estimate the magnitude and relative importance of this effect during growth in culture when other metabolic events influence the metabolism and physiology. For example, it should be expected that lactate formation counteracts the acid load in the cytoplasm because lactate exits the cell by simple diffusion as lactic acid, thus simultaneously transporting out a proton. However, in experiments in bioreactors, the cellular yield coefficients for the energy sources glucose and glutamine decreased substantially when NH_4Cl was added to the culture (data not shown). Addition of K^+ to a culture with NH_4Cl restored both growth rate and cellular yield coefficients to normal values (results will be published elsewhere).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Swedish National Board for Industrial and Technical Development and the Nordic Programme on Bioprocess Engineering under the auspices of NI, the Nordic Fund for Technology and Industrial Development.

References

- Aickin, C.C. and Thomas, R.C. (1977) An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J. Physiol.* 273, 295–316.
- Boron, W.F. and De Weer, P. (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J. Gen. Physiol.* 67, 91–112.
- Boron, W.F. (1977) Intracellular pH transients in giant barnacle muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 233, C61–C73.
- Boron, W.F. (1983) Transport of H⁺ and of ionic weak acids and bases. *J. Membrane Biol.* 72, 1–16.
- Docherty, P.A. and Snider, M.D. (1991) Effects of hypertonic and sodium-free medium on transport of a membrane glycoprotein along the secretory pathway in cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 146, 34–42.
- Gillies, R.J. and Martinez-Zaguilan, R. (1991) Regulation of intracellular pH in BALB/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 1551–1556.
- Glacken, M.W., Fleischaker, R.J. and Sinskey, A.J. (1986) Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1376–1389.
- Glacken, M.W. (1988) Catabolic control of mammalian cell culture. *Biotechnology* 6, 1041–1050.
- Glacken, M.W., Adema, E. and Sinskey, A.J. (1988) Mathematical description of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 491–506.
- Good, D.W., Knepper, M.A. and Burg, M.B. (1984) Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *Am. J. Physiol.* 247, F35–F44.
- Grinstein, S. and Rothstein, A. (1986) Mechanisms of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Membrane Biol.* 90, 1–12.
- Handbook of Chemistry and Physics (1984–1985), 65th edition. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. D167–D168.
- Kennedy, B.G. (1990) Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport in cultured cells derived from human retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.* 259, C29–C34.
- Kikeri, D., Sun, A., Zeidel, M.L. and Herbert S.C. (1989) Cell membranes impermeable to NH₃. *Nature* 339, 478–480.
- Knepper, M.A., Packer, R. and Good, D.W. (1989) Ammonium transport in the kidney. *Physiol. Rev.* 69, 179–249.
- Kovacevic, Z. and McGivan, J.D. (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol. Rev.* 63, 547–605.
- Livne, A. and Hoffmann, E.K. (1990) Cytoplasmic acidification and activation of Na⁺/H⁺ exchange during regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 114, 153–157.
- Ljunggren, J. and Häggström, L. (1990) Glutamine limited fed-batch culture reduces ammonium ion production in animal cells. *Biotechnol. Lett.* 12, 705–710.
- Ljunggren, J. and Häggström, L. (1992) Glutamine limited fed-batch culture reduces the overflow metabolism of amino acids in myeloma cells. *Cytotechnology* 8, 45–56.
- Lund, P., Brosnan, J.T. and Eggleston, L.V. (1970) The regulation of ammonia metabolism in mammalian tissues. In: Bartley, W. et al. (Eds.), *Essays in Cell Metabolism*, Wiley, New York, pp. 167–180.
- McKeehan, W.L. (1986) Glutaminolysis in animal cells. In: Morgan, M.J. (Ed.), *Carbohydrate metabolism in cultured cells*, Plenum, New York, pp. 111–150.

- McQueen, A. and Bailey, J.E. (1990a) Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 1067-1077.
- McQueen, A. and Bailey, J.E. (1990b) Mathematical modeling of the effects of ammonium ion on the intracellular pH of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 897-906.
- McQueen, A. and Bailey, J.E. (1991) Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioproc. Eng.* 6, 49-61.
- Miller, W.M., Wilke, C.R. and Blanch, H.W. (1988) Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioproc. Eng.* 3, 113-122.
- Ozturk, S.S., Riley, M.R. and Palsson, B.O. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 418-431.
- Post, R.L. and Jolly, P.C. (1957) The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 118-128.
- Post, R.L., Merrit, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D. (1960) Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 235, 1796-1802.
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J.D. and Miller, L. (1986) Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J. Immunol. Meth.* 86, 53-59.
- Roos, A. and Boron, W.F. (1981) Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61, 297-434.
- Rozengurt, E. and Heppel, A. (1975) Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ influx in quiescent 3T3 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4492-4495.
- Skou, J.C. (1960) The relationship of a $(\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+)$ -activated, K^+ -stimulated enzyme or enzyme system to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the cell membrane. In: Kleinzeller, A. and Kotyk, A. (Eds.), *Membrane Transport and Metabolism*. Academic Press, New York, pp. 228-236.

IN SITU REMOVAL OF AMMONIUM IONS FROM HYBRIDOMA CELL CULTURE MEDIA: SELECTION OF ADSORBENT

Yeon-Ho Jeong and Shaw S. Wang*
Department of Chemical and Biochemical Engineering
Rutgers University, Piscataway, NJ, 08855-0909, U.S.A.

ABSTRACT

Various ion-exchange resins and zeolite Phillipsite-Gismondine were tested for their potential application as adsorbents for the *in situ* removal of ammonium ions from animal cell culture media in attempting to increase hybridoma cell density and MAb productivity. A zeolite, Phillipsite-Gismondine demonstrated the best performance in terms of NH_4^+ adsorption capacity, selectivity and autoclavability among the various adsorbents tested. The biocompatibility of Phillipsite-Gismondine was also tested and the result showed improvement in cell density, viability, and antibody productivity.

INTRODUCTION

One of the most challenging problems in animal cell culture is the accumulation of waste metabolites because these metabolites such as NH_4^+ and lactate have been shown to inhibit both cell growth and product formation (Glacken *et al.*, 1988; Glacken, 1988; Miller *et al.*, 1988). The reactor productivity can be dramatically increased by reducing the concentration of those inhibitory waste metabolites as they are formed during cultivation of cells.

Mammalian cells produce NH_4^+ and lactate as waste metabolites of glutamine and glucose catabolism. In a culture with good pH control, ammonium ions are the most detrimental to cell growth (Jeong and Wang, 1990; Miller *et al.*, 1988).

The critical inhibitory concentrations of NH_4^+ for strain L mouse cells, chorioallantoic tissue, mouse ascites tumor cells, canine kidney cells (MDCK), and hybridoma cells have been reported to be 0.5 mM, 10 mM, 40 mM, 5-8 mM, and 3-5 mM respectively (Glacken, 1987). Furthermore, NH_4^+ also inhibits product formation. For example, interferon production by human fibroblast cells is inhibited by 50 % at 2 mM of NH_4^+ (Ito and McLimans, 1981). Vaccine production can also be inhibited by NH_4^+ . The growth of influenza (Jensen and Liu, 1961), Newcastle Disease (Eaton and Scala, 1961), and Columbia SK (Furusawa and Cutting, 1962) viruses were also reported to be inhibited by NH_4^+ .

It is important, therefore, to develop a method for removing NH_4^+ from the media in order to increase the productivities of bioreactors (Glacken, 1988). The simplest and the most promising method for the *in situ* removal of NH_4^+ from the cell culture media is by adsorption (Iio *et al.*, 1985; Jeong and Wang, 1990). To do so, it is most critical to select an adsorbent which is autoclavable, non-toxic and which has high adsorption capacity and high selectivity for NH_4^+ . Several tests were performed to select a good adsorbent based on the requirements mentioned above. *In situ* removal of NH_4^+ from the cell culture media with the selected adsorbent was performed, and the system performances are discussed in this report in terms of cell density, cell viability, and MAb productivity.

MATERIALS AND METHODS

CELL LINE

The mouse-mouse hybridoma cell line VIII H-8 used in this study was kindly given by New Brunswick Sci. Co.. These cells produce mouse immunoglobulin, IgG_{2a} which is specific for the whole cell of bacterium *Rhizobium japonicum* NR-7.

CULTURE MEDIA AND CELL PROPAGATION

The cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) containing 4.5 g/l of glucose, supplemented with 0.94 g/l of NCTC 135 (National Cancer Tissue Culture), oxaloacetate (150 mg/l), insulin (75.5 µg/l), sodium bicarbonate (40 mM), streptomycin (100 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and 5 % (v/v) calf bovine serum. The medium was filtered with 0.22 µm membrane.

Cells were cultivated in 75 cm² T-flask as a stationary culture and in 250 ml spinner flasks (Corning) of which working volume was 150 ml. T-flasks and spinner flasks were incubated at 37⁰ C in 7 % CO₂ atmosphere.

VIABLE CELL COUNTS

Cells were counted under microscopic examination after small amounts of sample was injected into a haemocytometer. Cell viability was determined by Trypan Blue exclusion method.

ANTIBODY ASSAY

The mouse immunoglobulin, IgG_{2a} was analyzed by using RID (Radial Immuno Diffusion) methods. Anti-IgG was immobilized in the agar on the RID plates. A centrifuged sample of 5 µl was injected into each sample hole on RID plates and incubated at 37⁰ C for 36 h. After incubation, ring was visualized by first staining with a buffaloblack stain solution and then rinsed with RID wash solution (5% v/v glacial acetic acid, 0.5 % v/v glycerol).

AMMONIUM ION

Ammonium ion concentration was measured using an Orion 9512 ammonium ion electrode (Cambridge MA, U.S.A.).

ADSORPTION EXPERIMENTS

Ammonium ion was adsorbed by 2.5 g each of Amberlite CG-120, Amberlite CG-50, Phillipsite-Gismondine, and Sordolite CW-18 in 50 ml of NH₄⁺ solution (5 mM initial concentration) with 200 rpm rotary shaking for 12 hours at 37⁰ C. Another sets of adsorption tests were performed in water or culture media with adsorbents which were autoclaved at 121⁰ C for 15 minutes before testing. Equilibrium was assured by measuring several NH₄⁺ concentrations until the adsorption kinetic curve leveled off.

RESULTS AND DISCUSSIONS

AMMONIUM ION TOXICITY

Ammonium chloride was added into culture medium to vary initial NH₄⁺ concentration. The cell growth and the concentration of monoclonal antibody produced in the T-flask were analyzed at different intervals. The effect of initial NH₄⁺ level on the specific cell growth rate is shown on Fig.1 and that on the monoclonal antibody production kinetics on Fig.2. Both specific growth rate and the highest accumulated monoclonal antibody concentration decrease as initial NH₄⁺ concentration increases, demonstrating NH₄⁺ toxicity to the hybridoma cell line tested. This NH₄⁺ toxicity could be caused by cytoplasmic acidification resulted from the uptake of the weak acid, NH₄⁺, into cytoplasm (McQueen and Bailey, 1990).

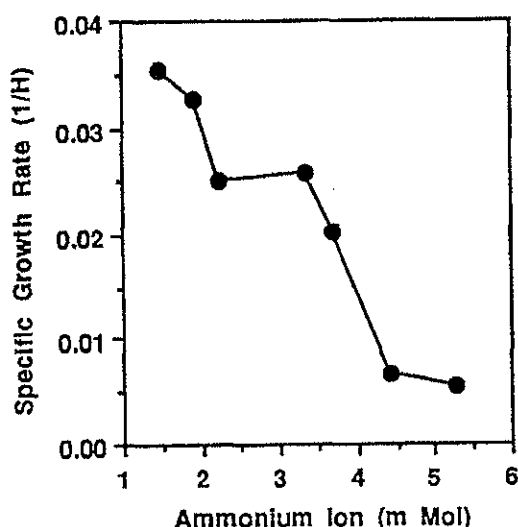


Fig.1 Effect of Ammonium Ion on Specific Growth Rate

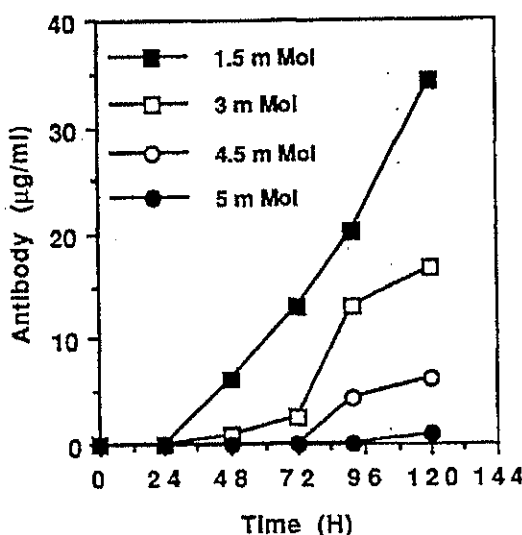


Fig.2 Effect of Initial Ammonium Ion on Antibody Production

SELECTION OF ADSORBENT

Not only high capacity and selectivity for NH_4^+ adsorption but also autoclavability and non-toxicity to hybridoma cells are required for the adsorbents to be used in the *in situ* removal of NH_4^+ in the hybridoma cell culture system. Four adsorbents were tested. Amberlite CG-120 is a strongly acidic cation exchanger, a styrene-divinylbenzene copolymer with a sulfonic group. Amberlite CG-50 is a styrene-divinylbenzene copolymer with a weak acidic carboxyl group. Serdolite CW-18 is a weak acidic cation exchanger with a carboxylic group on the basis of polyacrylic acid. Phillipsite-Gismondine is a synthetic zeolite which has an identical structure to natural zeolite 'Merlinolite' (Passaglia *et al.*, 1977).

Fig.3 represents the studies of adsorption capacity and autoclavability of various adsorbents in NH_4^+ solution (initial 5 mM in water). In order to keep the culture system aseptic, adsorbents need to be autoclaved before applying to the media. It is desirable for an adsorbent not to lose its adsorptive capacity after autoclaving. However CG-120, CG-50, and Serdolite exhibit slight decrease in adsorption capacity after autoclaving, implying that their pore structures or functional groups are probably modified by heat. For example, thermal stress will cause the decomposition of sulfonic acid group of CG-120. On the other hand, Phillipsite-Gismondine demonstrates invariant capacity, indicating that the structure of Phillipsite-Gismondine is thermally stable because of its crystalline structure (Passaglia *et al.*, 1977). Therefore, Phillipsite-Gismondine exhibits best performance in autoclavability. In this figure, Phillipsite-Gismondine also shows the highest NH_4^+ adsorption capacity among the adsorbents tested. Fig.4 shows the final NH_4^+ concentration reached after treating 5 mM NH_4^+ solution with various adsorbents. It demonstrates that Phillipsite-Gismondine can easily maintain very low NH_4^+ concentration because it can remove about 98 % of NH_4^+ initially presented under the experimental conditions.

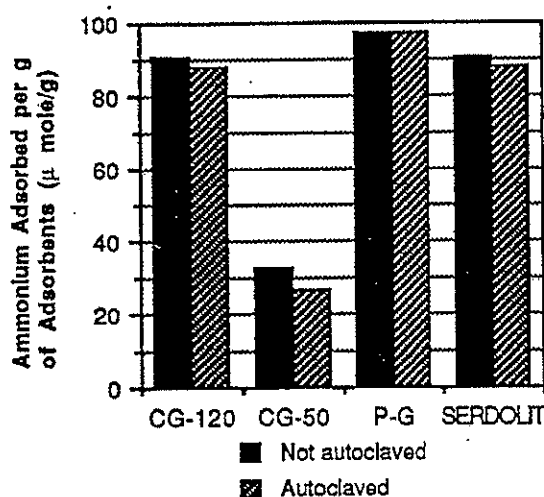


Fig.3 Ammonium Ion Adsorption Capacity Change after Autoclaving

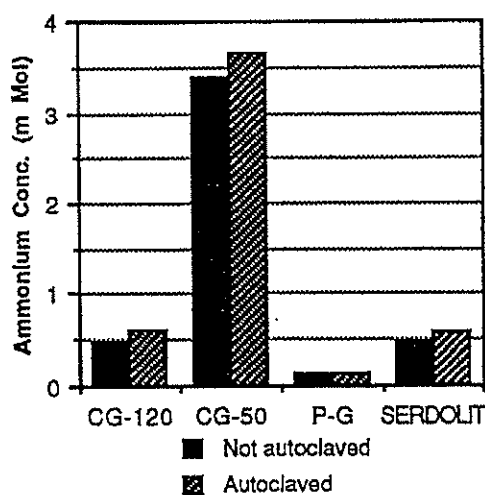


Fig.4 Final Ammonium Ion concentration

Fig.5 shows the studies of NH_4^+ selectivity of various adsorbents in typical animal cell culture media, DMEM and Joklik's medium. There are many kinds of NH_4^+ competitive ions such as Ca^{++} , Na^+ , Mg^{++} , etc., in most animal cell culture. Those competitors bind to the active site of adsorbent, so the available active sites for NH_4^+ adsorption can be easily reduced, consequently low selectivity for NH_4^+ would be expected. Eventhough CG-120 and Serdolite demonstrated relatively high NH_4^+ adsorption capacity in water which is comparable with that of Phillipsite-Gismondine as shown on Fig.3, they show respectively 58 % and 35 % decreases in NH_4^+ adsorption capacity in media. Whereas, Phillipsite-Gismondine shows only 9 % decrease in adsorption capacity. It may be because ion exchangers are usually very sensitive to bivalent ions such as Ca^{++} and Mg^{++} which are subject to strong electrostatic attraction, while zeolite can exclude those ions by size differentials in addition to electrostatic selectivity. Therefore Phillipsite-Gismondine shows the best NH_4^+ selectivity from the culture media of complex ions as well as the best NH_4^+ adsorbing capacity among the adsorbents tested.

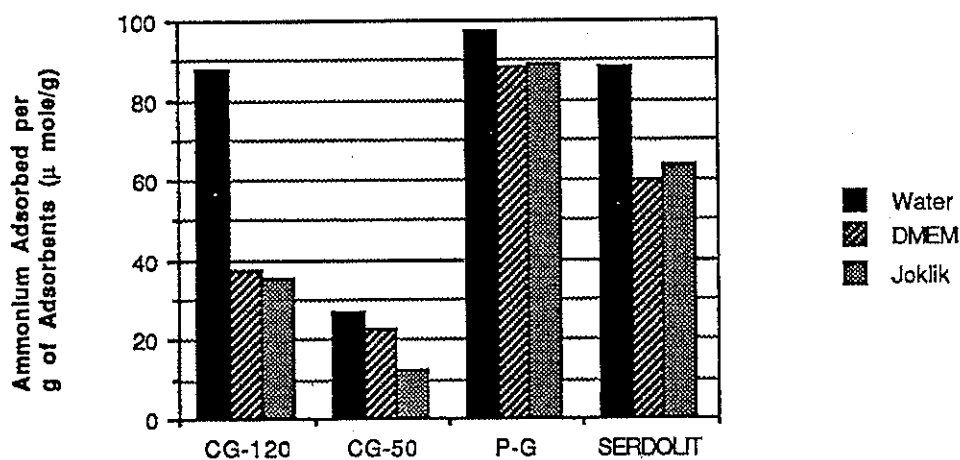


Fig.5 Ammonium Ion Selectivity of Various Adsorbents In Culture Media

BIOCOMPATIBILITY AND IN-SITU REMOVAL OF AMMONIUM ION

Fig.6 shows the result of live cell growth kinetics of hybridoma cells with and without adding zeolite powder in the media. Hybridoma cells were cultured with 0.75 g of Phillipsite-Gismondine powder in a spinner flask of 150 ml working volume at 60 rpm. Fig.7 shows cell viability change and Fig.8 shows NH_4^+ concentration change with respect to time in this run. Applying Phillipsite-Gismondine powder results in 15 % increase in live cell number and 28 % increase in viability after 154 hours. At the same time the difference in NH_4^+ concentration between two spinners becomes significant as shown on Fig.8. So, *in situ* removal of NH_4^+ by Phillipsite-Gismondine can stimulate cell growth and this material is not toxic and it is compatible with hybridoma cells tested. According to Fig.8, the final NH_4^+ concentration of culture with adsorbent is only half of that without adsorbent, demonstrating that Phillipsite-Gismondine can reduce NH_4^+ concentration to below toxic level in later phase of culture. Fig.9 shows the monoclonal antibody (IgG_{2a}) production kinetics in the same run. The enhancement in live cell growth due to maintenance of low NH_4^+ concentration results in 16 % increase in the concentration of monoclonal antibody. Therefore *in situ* removal of NH_4^+ by Phillipsite-Gismondine could stimulate not only cell growth but also monoclonal antibody production.

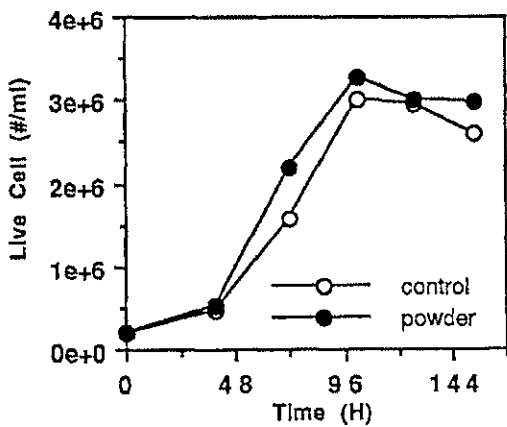


Fig.6 Live Cell Growth Kinetics

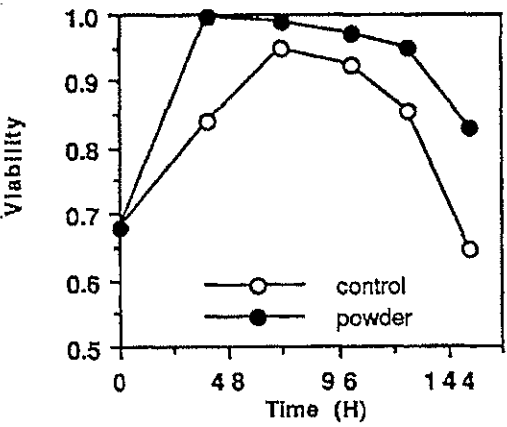


Fig.7 Cell Viability Kinetics

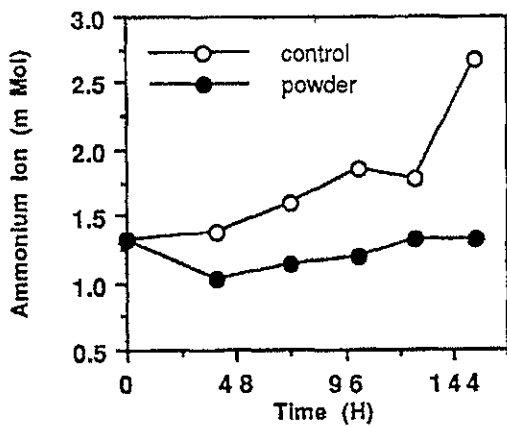


Fig.8 Ammonium Ion Concentration Kinetics

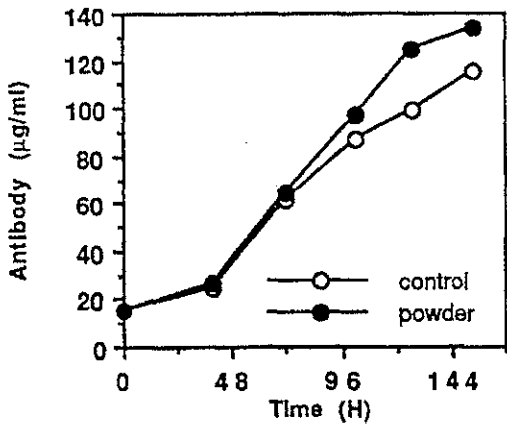


Fig.9 Monoclonal Antibody Kinetics

Although the last few graphs all show positive effects, it is also seen that the effects are rather moderate. This may be caused by following two reasons. The first reason is that the cells in the culture does not produce high enough NH_4^+ to raise up to a seriously toxic level. The final NH_4^+ concentration of culture without adsorbents is only 2.7 mM as shown on Fig.8. According to Fig.1, this level of NH_4^+ is estimated to cause only 30 % decrease in specific growth rate. Another reason is that the nutrient depletion in later phase hampers further increase in cell growth eventhough NH_4^+ accumulation problem has been overcome by adding adsorbents. Nutrient depletion is expected to be more serious in case of culture with adsorbent due to better cell growth and higher antibody production. Therefore, it is suggested that further increase in cell growth and antibody production can be accomplished by combining fed-batch (additional feeding of key nutrients such as glucose and glutamine) and *in situ* removal of NH_4^+ . The combined system which is free of nutrient depletion by fed-batch and free of NH_4^+ accumulation by adsorption showed 60 % increase of final cell density in another experiment. These results will be reported elsewhere very soon.

CONCLUSIONS

NH_4^+ is toxic to the growth of VIII H-8 cells and production of IgG_{2a}. Ammonium ion can be removed *in situ* by adding adsorbent directly to cell culture media. Phillipsite-Gismondine showed the best characteristics in NH_4^+ adsorption capacity, NH_4^+ selectivity, stability in adsorption capacity after autoclaving, and biocompatibility with hybridoma cells. Application of Phillipsite-Gismondine to actual culture system shows better cell growth, higher cell viability, higher antibody productivity and the ability of maintaining low NH_4^+ concentration throughout the culture period. Therefore, Phillipsite-Gismondine can be successfully used as an adsorbent for *in situ* removal of NH_4^+ from animal cell culture media as part of a comprehensive strategy to accomplish high cell density and high monoclonal antibody productivity.

REFERENCES

- Eaton, M.D. and Scala, A.R. (1961). *Virology*, 13, 300-307.
- Furusawa, E. and Cutting, W. (1962). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 111, 71-75.
- Glacken, M.W., Adema, E., and Sinskey, A.J. (1988). *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 491-506.
- Glacken, M.W. (1987). Ph.D. thesis, MIT.
- Glacken, M.W. (1988). *Biotechnology*, 6, 1041-1050.
- Iio, M., Moriyama, A., and Murakami, H. (1985). In: Growth and Differentiation of cells in Defined Environment, Murakami, H. *et al.*, eds., pp.437-442, New York: Springer.
- Ito, M. and McLimans, W.F. (1981). *Cell Biol. Int. Rep.*, 5, 661-666.
- Jensen, E.M. and Liu, O.C. (1961). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 107, 834-838.
- Jeong, Y.H. and Wang, S.S. (Nov.12, 1990). AIChE National meeting, Chicago, Abstract 100A.
- McQueen, A. and Bailey, J.E. (1990). *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 897-906.
- Miller, W.M., Wilke, C.R., and Blanch, H.W. (1988). *Bioprocess Eng.*, 3, 113-122.
- Passaglia, E., Pongiluppi, D., and Rinaldi, R. (1977). *Neues Jahrbuch für Mineralogie, Monatshefte*, H.8, 355-364.