



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718713-0 A2



(22) Data de Depósito: 07/11/2007
(43) Data da Publicação: 26/11/2013
(RPI 2238)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/00

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO EM UMA CULTURA CELULAR; POLIPEPTÍDIO PRODUZIDO DE ACORDO COM MÉTODO; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O POLIPEPTÍDIO; MEIO DE CULTURA CELULAR; MEIO DE CULTURA CELULAR PARA USO NA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO DE INTERESSE; MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UMA CONCENTRAÇÃO OTIMIZADA DE UM AMINOÁCIDO USADO EM UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A PRODUÇÃO DE UM POLIPETÍDIO DE INTERESSE EM UMA CULTURA CELULAR.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2006 US 60/858,289

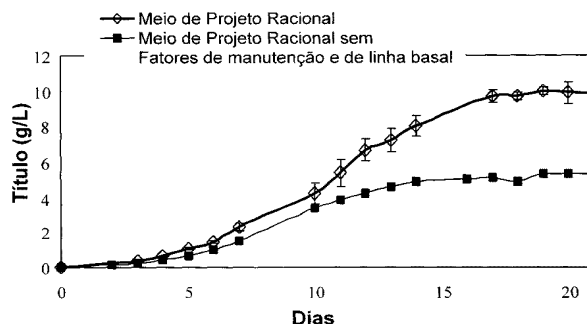
(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): Denis Drapeau, Ryan Nolan, Wenge Wang, Yen-Tung Luan

(74) Procurador(es): Trench, Rossi e Watanabe Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT US2007083947 de 07/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/063892de 29/05/2008



"MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO EM UMA CULTURA CELULAR; POLIPEPTÍDIO PRODUZIDO DE ACORDO COM MÉTODO; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O POLIPEPTÍDIO; MEIO DE CULTURA CELULAR; MEIO DE CULTURA CELULAR PARA USO NA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO DE INTERESSE; MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UMA CONCENTRAÇÃO OTIMIZADA DE UM AMINOÁCIDO USADO EM UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO DE INTERESSE EM UMA CULTURA CELULAR"

10

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Norte-Americana Provisória nº 60/858.289, depositado em 8 de November 15 de 2006, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua inteireza.

Campo da Invenção

Esta invenção se refere a métodos para projetar racionalmente meios de cultura celular para uso em culturas celulares empregadas, por exemplo, na 20 produção de polipeptídios; a meios de cultura celular projetados com os métodos apresentados; a métodos de produção de grandes quantidades de um polipeptídio de interesse, por exemplo, um anticorpo, usando-se esses

meios; a polipeptídios produzidos usando-se os métodos e aos meios aqui apresentados; e a composições farmacêuticas contendo esses polipeptídios. A invenção é particularmente útil em culturas celulares em grande
5 escala. Os métodos e composições aqui apresentados são particularmente úteis para produzir quantidades significativas de polipeptídios em culturas de células animais por bateladas, alimentação-bateladas e perfusão.

10 Fundamentos da Técnica Relacionada

Uma grande proporção de produtos de biotecnologia, quer comercialmente disponíveis, quer apenas em desenvolvimento, são proteínas terapêuticas; assim, há demanda de produção desses polipeptídios em
15 culturas celulares. Além disso, a maquinaria celular de uma célula animal (em oposição a, por exemplo, uma célula bacteriana) é frequentemente requerida para produzir muitas formas de polipeptídios terapêuticos (como proteínas glicosiladas ou anticorpos monoclonais
20 produzidos em hibridomas (MAbs)). Consequentemente, há uma demanda crescente de otimização da produção desses polipeptídios em culturas celulares e particularmente em culturas de células animais.

Em comparação com culturas de células bacterianas, as culturas de células animais têm menores taxas de produção e tipicamente geram menores rendimentos de produção. Assim, uma quantidade significativa de pesquisa focaliza condições de cultura de células animais que otimizam a produção de polipeptídios, isto é, condições que sustentem uma elevada densidade celular e altos títulos. Por exemplo, determinou-se que a manutenção de concentrações de glicose em meios de cultura celular a baixas concentrações e o cultivo das células em uma fase de produção a uma osmolalidade de cerca de 400 a 600 mOsm aumenta a produção de proteínas recombinantes pelas culturas de células animais, em que o cultivo em todas as fases também é a uma concentração selecionada de glutamina (de preferência entre cerca de 0,2 e cerca de 2 mM). Também se determinou que uma alimentação restrita de glicose às culturas de células animais em processos por alimentação-bateladas controla a produção de lactato sem requerer a alimentação a taxa constante de glicose. Além disso, sabe-se que a modificação da concentração cumulativa total de aminoácidos, da concentração de aminoácidos individuais e das razões de aminoácidos individuais entre si (por exemplo,

glutamina para asparagina) e para os aminoácidos totais (por exemplo, glutamina para aminoácidos totais) nos meios de uma cultura celular em grande escala pode resultar em uma produção de polipeptídios em grande
5 escala substancialmente melhor.

Tradicionalmente, estudos de meios para as culturas de células animais focalizam três técnicas: 1) enriquecimento dos componentes de meio do meio de partida e aumento da frequência de alimentação da
10 cultura; 2) aplicação de um projeto multifatorial a diferentes forças de meio e diferentes concentrações de componentes; e 3) análise do meio condicionado (gasto) quanto a aminoácidos, vitaminas e outros componentes e
adição dos componentes que estão em baixos níveis ou
15 foram depletados. Esses métodos em geral usam respostas de densidade celular, viabilidade e título como indicadores de otimização.

Entretanto, os métodos acima só detectam indiretamente as exigências de nutrientes para células
20 com base no resultado final, isto é, densidade celular, viabilidade e título, em vez de detectarem e fornecerem às células as exigências de nutrientes reais para uma produção otimizada de proteínas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta métodos para projetar racionalmente meios de cultura celular, por exemplo, meios de cultura celular em grande escala, para uso, por exemplo, em culturas celulares em grande
5 escala empregadas na produção de polipeptídios; meios de cultura celular, por exemplo, meios de cultura celular em grande escala, projetados com os métodos apresentados; métodos de produção de grandes quantidades de um polipeptídio de interesse, por
10 exemplo, um anticorpo, usando-se esses meios; polipeptídios produzidos usando-se os métodos e os meios aqui apresentados; e composições farmacêuticas contendo esses polipeptídios. Esses métodos e composições são utilizáveis para a cultura, por
15 exemplo, cultura por bateladas, alimentação-bateladas e perfusão, de células. Esses métodos e composições são particularmente úteis para cultura em grande escala, por exemplo, cultura por bateladas, alimentação-bateladas e perfusão, de células animais, por exemplo,
20 células de mamíferos.

Um meio racionalmente projetado da presente invenção contém uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção

celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse.

Em uma modalidade, a invenção apresenta um método de produção de um polipeptídio em uma cultura celular, compreendendo a formação de uma cultura celular que compreenda células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse, e um meio de cultura celular desejado, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse; e a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura celular desejado compreende uma concentração de aminoácido ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula

$$A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F,$$

em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para

uma densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal.

5 Em outra modalidade, a invenção apresenta um método de produção de um polipeptídio em uma cultura celular, compreendendo a formação de uma cultura celular que compreenda células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse; e
10 um meio de cultura celular de partida, em que o volume do meio de cultura celular de partida é de cerca de 60-99% do volume de um volume de meio de cultura celular desejado; o fornecimento de um meio de cultura celular de alimentação à cultura celular, em que o volume do
15 meio de cultura celular de alimentação é de cerca de 1-40% do volume de meio de cultura celular desejado, e em que o meio de cultura celular desejado resultante compreende uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração
20 do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse; e a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de

interesse. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura celular desejado resultante compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em

5 que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para uma densidade

10 celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal; e a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a

15 expressão do polipeptídio de interesse. Em outra modalidade da invenção, o meio de cultura celular de partida compreende uma concentração, B, do aminoácido de acordo com a fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, em que Z é uma concentração do aminoácido no meio de cultura

20 celular de alimentação, e V é um volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume de meio de cultura celular desejado. Em outra modalidade dos métodos aqui apresentados, Y é de 0 a cerca de 1,5. Em ainda outra modalidade dos métodos aqui

apresentados, F é de cerca de 1 a cerca de 1,5. Em uma modalidade adicional dos métodos aqui apresentados, Y é de 0 a cerca de 1,5, e F é de cerca de 1 a cerca de 1,5.

5 Em uma modalidade dos métodos aqui apresentados, o meio de cultura celular desejado compreende mais do que ou o mesmo que cerca de 3 mM de tirosina. Em outra modalidades dos métodos aqui apresentados, o meio de cultura celular desejado
10 compreende: entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de leucina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de lisina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de treonina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de prolina; e/ou entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de
15 valina. Em uma modalidade adicional dos métodos aqui apresentados, a concentração combinada de leucina, lisina, treonina, prolina e valina no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 35 mM e cerca de 150 mM. Em ainda outra modalidade, a concentração
20 combinada de leucina, lisina, treonina e valina no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 60% e cerca de 80% da concentração dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura celular desejado.

Em uma modalidade dos métodos aqui apresentados, a concentração combinada dos aminoácidos essenciais no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 30% e cerca de 50% da concentração dos aminoácidos totais no meio de cultura celular desejado. 5 Em outra modalidade dos métodos aqui apresentados, a concentração de aminoácidos no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM. Em uma modalidade adicional dos métodos aqui 10 apresentados, a concentração de prolina na cultura celular é mantida em mais de cerca de 1 mM. Em ainda outra modalidade dos métodos aqui apresentados, a concentração de prolina na cultura celular é mantida em mais de cerca de 2 mM. Em algumas modalidades dos 15 métodos de produção de um polipeptídio, a cultura celular é uma cultura celular em grande escala. Em outras modalidades, as células são células animais.

Um aspecto adicional da invenção apresenta polipeptídios produzidos de acordo com os métodos aqui 20 apresentados. Outro aspecto da invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídio produzido de acordo com os métodos aqui apresentados e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Um aspecto adicional da invenção apresenta um método de cultura celular compreendendo: a formação de uma cultura celular compreendendo células; e um meio de cultura celular desejado compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular; e a manutenção da cultura celular sob condições que permitam o crescimento e replicação das células na cultura celular. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura celular desejado compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, M é um multiplicador para uma densidade celular de pico desejada da cultura celular, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal. Em algumas modalidades dos métodos de cultura celular, a cultura celular é uma cultura celular em grande escala. Em outras modalidades, as células são células animais.

Um aspecto adicional da invenção apresenta um meio de cultura celular compreendendo uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de

350 mM. Outro aspecto da invenção apresenta um meio de cultura celular para uso na produção de um polipeptídio de interesse, compreendendo uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM.

5 Outro aspecto da invenção apresenta um meio de cultura celular para uso na produção de um polipeptídio de interesse, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é
10 calculada para uso na manutenção celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura celular para uso na produção de um polipeptídio de interesse
15 compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para
20 incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para a densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para a concentração desejada do

polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal.

Ainda outro aspecto da invenção apresenta um meio de cultura celular compreendendo uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A', de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, M é um multiplicador para a densidade celular de pico desejada da cultura celular, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular é um meio de cultura celular em grande escala. Em outras modalidades, o meio de cultura celular é um meio de cultura de células animais.

Ainda outro aspecto da invenção apresenta um método para a determinação de uma concentração otimizada de um aminoácido usado em um meio de cultura celular para a produção de um polipeptídio de interesse em uma cultura celular, compreendendo: a determinação da concentração de aminoácido requerida para a massa celular das células na cultura celular a uma densidade celular alvo; a determinação da concentração de aminoácido requerida para produzir o polipeptídio de interesse na cultura celular a um título alvo de

polipeptídio; a determinação da concentração de aminoácido requerida para a manutenção celular das células na cultura celular; e a adição das concentrações para fornecer uma concentração otimizada do aminoácido usado no meio de cultura celular para a produção do polipeptídio de interesse na cultura celular.

Um aspecto adicional da invenção apresenta um método para a determinação de uma concentração de aminoácido otimizada, A, de um aminoácido usado em um meio de cultura celular para a produção de um polipeptídio de interesse em uma cultura celular, compreendendo: a determinação da concentração de aminoácido, X, requerida para a massa celular das células a uma densidade celular estabelecida; a determinação da concentração de aminoácido, P, requerida para produzir o polipeptídio de interesse a um título de polipeptídio estabelecido; e a determinação da concentração de aminoácido otimizada, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (M \cdot Y \cdot X)] \cdot F$, em que M é um multiplicador para uma densidade celular alvo desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração alvo desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular; e F é um

fator de linha basal. Em algumas modalidades dos métodos para a determinação de uma concentração de aminoácido otimizada, a cultura celular é uma cultura celular em grande escala. Em outras modalidades, as
5 células são células animais.

Outras características e vantagens da invenção ficarão claras com a descrição detalhada e as reivindicações a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

10 A Figura 1 representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no meio racionalmente projetado do Exemplo 2.

15 A Figura 2 representa o título (eixo Y; "Título (g/L)") de anticorpo anti-IL-22 com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no meio racionalmente projetado do Exemplo 2.

20 A Figura 3 representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no meio racionalmente projetado do Exemplo 3.

A Figura 4 representa o título (eixo Y; "Título (g/L)") de anticorpo anti-IL-22 com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no
5 meio racionalmente projetado do Exemplo 3.

A Figura 5 representa o título (eixo Y; "Título (g/L)") de anticorpo anti-IL-22 com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em
10 "Meio Tradicional" (um meio à base de exigências de cultura celular tradicionais, veja, por exemplo, Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº 2006/0121568), "Meio de Projeto Racional" preparado usando-se os presentes métodos ou "Meio Tradicional + Prolina", que
15 contém mais 3,7 mM de prolina adicionada ao "Meio Tradicional" (veja Exemplo 4).

A Figura 6 representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas
20 para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio Tradicional", "Meio de Projeto Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (veja Exemplo 4).

A Figura 7 representa a viabilidade celular (eixo Y; "Viabilidade [%]") com o tempo (eixo X;

"Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio Tradicional", "Meio de Projeto Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (veja Exemplo 4).

5 A Figura 8 representa a concentração do aminoácido designado (eixo Y; "[μ M]") ((Figura 8A) prolina; (Figura 8B) treonina; (Figura 8C) valina; (Figura 8D) triptofano; ou (Figura 8E) tirosina) com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio Tradicional", "Meio de Projeto Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (veja Exemplo 4).

15 A Figura 9 representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio de Projeto Racional" ou "Meio de Projeto Racional sem fatores de manutenção e basais". A figura é representativa de 5 réplicas independentes (n=5) (veja Exemplo 6).

20 A Figura 10 representa a viabilidade celular (eixo Y: "Viabilidade (%)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio de

Projeto Racional" ou "Meio de Projeto Racional sem fatores de manutenção e basais". A figura é representativa de 5 réplicas independentes (n=5) (veja Exemplo 6).

5 A Figura 11 representa o título de anticorpo (eixo Y; "Título (g/L)") com o tempo (eixo X; "Dias") para células CHO manipuladas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas em "Meio de Projeto Racional" ou "Meio de Projeto Racional sem fatores de
10 manutenção e basais". A figura é representativa de 5 réplicas independentes (n=5) (veja Exemplo 6).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O termo "cultura por bateladas", conforme aqui usado, refere-se a um método de cultivo de células
15 em que todos os componentes que serão por fim usados no cultivo das células, incluindo o meio, assim como as próprias células, são fornecidos no início do processo de cultivo. Uma cultura por bateladas é tipicamente interrompida em algum ponto, e as células e/ou
20 componentes no meio são colhidos e opcionalmente purificados.

O termo "cultura por alimentação-bateladas", conforme aqui usado, refere-se a um método de cultivo de células em que componentes adicionais são fornecidos

à cultura em algum momento subsequente ao início do processo de cultura. Os componentes fornecidos compreendem tipicamente suplementos nutricionais para as células que tenham sido depletados durante o processo de cultivo. A cultura por alimentação-bateladas é tipicamente interrompida em algum ponto, e as células e/ou componentes no meio são colhidos e opcionalmente purificados. Em uma modalidade preferida da presente invenção, a cultura celular é uma cultura de células animais, por exemplo, uma cultura de células de mamíferos, isto é, uma cultura por bateladas ou por alimentação-bateladas.

O termo "cultura por perfusão", conforme aqui usado, refere-se a um método de cultivo de células em que componentes adicionais são fornecidos contínua ou semicontinuamente à cultura subsequentemente ao início do processo de cultura. Os componentes fornecidos compreendem tipicamente suplementos nutricionais para as células que tenham sido depletados durante o processo de cultivo. Partes das células e/ou componentes no meio são tipicamente colhidos em base contínua ou semicontínua e são opcionalmente purificados.

O termo "biorreator", conforme aqui usado, refere-se a qualquer recipiente usado para o crescimento de uma cultura de células procarióticas ou eucarióticas, por exemplo, uma cultura de células animais (como uma cultura de células de mamíferos). O biorreator pode ser de qualquer tamanho, contanto que seja utilizável para o cultivo de células, por exemplo, células de mamíferos. Tipicamente, o biorreator será de pelo menos 30 mL e pode ser de 1, 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.0000 litros ou mais, ou qualquer volume intermediário. As condições internas do biorreator, incluindo, mas não limitadas a, pH e temperatura, são tipicamente controladas durante o período de cultivo. O biorreator pode ser composto por qualquer material que seja adequado para manter culturas de células de mamíferos em suspensão em meios sob as condições de cultura da presente invenção, incluindo vidro, plástico ou metal. O termo "biorreator de produção", conforme aqui usado, refere-se ao biorreator final usado na produção do polipeptídio ou proteína de interesse. O volume de um biorreator de produção de cultura celular em grande escala em geral é maior que cerca de 100 mL, tipicamente de pelo menos cerca de 10 litros e pode ser de 500, 1.000, 2.500,

5.000, 8.000, 10.000, 12.0000 litros ou mais, ou qualquer volume intermediário. Aqueles versados na técnica conhecerão, e serão capazes de escolher, biorreatores adequados para uso na prática da presente invenção.

Os termos "densidade celular", "concentração celular" ou outros, conforme aqui usados, referem-se ao número, peso, massa e outros de células presentes em um dado volume de meio. "Densidade celular de pico" ou similar se refere ao número máximo de células que se pode atingir em um dado volume de meio, e "densidade celular de pico desejada" ou similar se refere ao número máximo de células que um praticante deseja obter (por exemplo, alvos) em um dado volume de células.

15 Variações desse(s) valor(es) de alvo ficarão claras para aqueles versados na técnica, por exemplo, alguém versado pode expressar um valor(es) de alvo em termos de massa celular desejada, e esse(s) valor(es) de alvo pode(m) estar em um ou mais unidades de medida

20 apropriadas (por exemplo, unidades de massa celular de pico desejada).

O termo "viabilidade celular", conforme aqui usado, refere-se à capacidade de células em cultura de sobreviverem sob um dado conjunto de condições de

cultura ou variações experimentais. O termo, conforme aqui usado, também se refere à parte de células que estão vivas em um momento particular com relação ao número total de células, vivas e mortas, na cultura nesse momento.

Os termos "cultura" e "cultura celular", conforme aqui usados, referem-se a uma população de células que esteja em suspensão em um meio de cultura celular sob condições adequadas para a sobrevivência e/ou crescimento da população de células. Conforme aqui usados, esses termos podem se referir à combinação compreendendo a população de células (por exemplo, a cultura de células animais) e o meio em que a população está em suspensão.

O termo "densidade de células viáveis integrada" ou "IVC", conforme aqui usado, refere-se à densidade média de células viáveis no decorrer da cultura multiplicada pela quantidade de tempo que a cultura prosperou. Considerando-se que a quantidade de polipeptídio e/ou proteína produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes no decorrer da cultura, a densidade de células viáveis integrada é uma ferramenta útil para estimar a quantidade de

polipeptídio e/ou proteína produzida no decorrer da cultura.

Os termos "meio", "meio de cultura celular" e "meio de cultura", conforme aqui usados, referem-se a
5 uma solução contendo nutrientes que alimentem células animais, por exemplo, de mamífero, em crescimento. Tipicamente, essas soluções fornecem aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, fontes de energia, lipídios e elementos residuais requeridos pela
10 célula para crescimento mínimo e/ou sobrevivência. A solução também pode conter componentes que intensifiquem o crescimento e/ou sobrevivência acima da taxa mínima, incluindo hormônios e fatores de crescimento. A solução é, de preferência, formulada em
15 um pH e concentração de sal ótimos para a sobrevivência e proliferação celular. Em uma modalidade, o meio é um meio definido. Meios definidos são meios em que todos os componentes têm uma estrutura química conhecida. Em outra modalidade da invenção, o meio pode conter um
20 aminoácido(s) derivado(s) de qualquer fonte ou método conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, um aminoácido(s) derivado(s) de adição(ões) de um único aminoácido ou de adição(ões) de peptona ou hidrolisado

de proteína (incluindo fonte(s) animal(ais) ou vegetal(ais)).

O termo "semeadura", conforme aqui usado, refere-se ao processo de fornecer uma cultura celular a um biorreator ou outro recipiente. As células podem ter sido anteriormente propagadas em outro biorreator ou recipiente. Alternativamente, as células podem ter sido congeladas e descongeladas antes, por exemplo, imediatamente antes, de serem fornecidas ao biorreator ou recipiente. O termo se refere a qualquer número de células, incluindo uma única célula.

O termo "título", conforme aqui usado, refere-se à quantidade total de polipeptídio de interesse produzido por uma cultura de células animais, dividida por uma dada quantidade de volume de meio; assim, "título" se refere a uma concentração. O título é tipicamente expresso em unidades de miligramas de polipeptídio por mililitro de meio.

Conforme aqui usado, o termo "anticorpo" inclui uma proteína compreendendo pelo menos, e tipicamente dois, domínios VH ou suas partes e/ou pelo menos um, e tipicamente dois, domínios VL ou suas partes. Em certas modalidades, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias pesadas de imunoglobulina e

duas cadeias leves de imunoglobulina, em que as cadeias pesada e leve de imunoglobulina estão interconectadas, por exemplo, por ligações dissulfeto. Os anticorpos, ou uma parte deles, podem ser obtidos de qualquer origem, incluindo, mas não limitadas a, roedores, primatas (por exemplo, primatas humanos e não humanos), camelídeos e outros, ou podem ser produzidos de maneira recombinante, por exemplo, quiméricos, humanizados e/ou gerados *in vitro*, por exemplo, por métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo incluem, mas não se limitam a, (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb, que consiste em um domínio VH; (vi) um domínio variável de cadeia pesada de camelídeo ou camelizado (VHH); (vii) um Fv de cadeia única (scFv; veja abaixo); (viii) um anticorpo biespecífico; e (ix)

um ou mais fragmentos de uma molécula de imunoglobulina fusionados a uma região Fc. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, podem ser unidos, usando-se métodos recombinantes, por um elo sintético que permita que sejam preparados como uma única cadeia de proteína, em que as regiões VL e VH estejam pareadas para formar moléculas monovalentes (conhecidas Fv de cadeia única (scFv)); veja, por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83). Esses anticorpos de cadeia única também devem ser englobados dentro do termo "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos podem ser obtidos usando-se técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto à função da mesma maneira que anticorpos intactos.

O "fragmento de ligação a antígeno" também pode opcionalmente incluir uma fração que intensifique uma ou mais dentre, por exemplo, estabilidade, função de células efectoras ou fixação de complemento. Por exemplo, o fragmento de ligação a antígeno também pode incluir uma fração pegilada, albumina ou uma região constante de cadeia pesada e/ou leve.

Exceto por anticorpos "biespecíficos" ou "bifuncionais", entende-se que um anticorpo tenha cada um de seus sítios de ligação idênticos. Um "anticorpo bifuncional" ou "biespecífico" é um anticorpo híbrido artificial com dois pares de cadeias pesadas/leves diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por vários métodos, incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, 5 Songsivilai e Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-21; Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547-53.

A expressão "proteína" ou "produto de proteína" se refere a uma ou mais cadeias de aminoácidos. Conforme aqui usado, o termo "proteína" é 15 sinônimo de "polipeptídio" e, conforme é genericamente entendido na técnica, refere-se a pelo menos uma cadeia de aminoácidos ligados mediante ligações peptídicas sequenciais. Em certas modalidades, uma "proteína de interesse" ou um "polipeptídio de interesse" é uma 20 proteína codificada por uma molécula de ácido nucléico exógena que tenha sido transformada em uma célula hospedeira. Em certas modalidades, em que a "proteína de interesse" é codificada por um DNA exógeno com o

qual a célula hospedeira tenha sido transformada, a sequência de ácido nucléico do DNA exógeno determina a sequência de aminoácidos. Em certas modalidades, uma "proteína de interesse" é uma proteína codificada por uma molécula de ácido nucléico que seja endógena à célula hospedeira. Em certas modalidades, a expressão dessa proteína de interesse endógena é alterada por transfecção de uma célula hospedeira com uma molécula de ácido nucléico exógena que possa, por exemplo, conter uma ou mais sequências reguladoras e/ou codifique uma proteína que intensifique a expressão da proteína de interesse. Métodos e composições da presente invenção podem ser usados para produzir qualquer proteína de interesse, incluindo, mas não limitadas a, proteínas com propriedades farmacêuticas, diagnósticas, agrícolas e/ou qualquer uma de várias outras que sejam utilizáveis em aplicações comerciais, experimentais e/ou outras. Além disso, uma proteína de interesse pode ser uma proteína terapêutica. A saber, uma proteína terapêutica é uma proteína que tenha um efeito biológico em uma região do corpo em que aja ou em uma região do corpo em que aja remotamente mediante intermediários. Exemplos de proteínas terapêuticas são discutidas em maiores detalhes abaixo. Em certas

modalidades, proteínas produzidas usando-se métodos e/ou composições da presente invenção podem ser processadas e/ou modificadas. Por exemplo, uma proteína a ser produzida de acordo com a presente invenção pode ser glicosilada.

A presente invenção pode ser usada para cultivar células para a produção vantajosa de qualquer proteína terapêutica, como enzimas, receptores, anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais e/ou policlonais), proteínas de fusão Fc, citocinas, hormônios, fatores reguladores, fatores de crescimento, fatores de coagulação, agentes de ligação a antígeno farmacêutica ou comercialmente relevantes e outras. Aqueles versados na técnica conhecerão outras proteínas que podem ser produzidas de acordo com a presente invenção e serão capazes de usar os métodos aqui apresentados para produzir essas proteínas.

Construtos de Expressão e Geração de Células Hospedeiras Recombinantes

A presente invenção usa células hospedeiras recombinantes, por exemplo, células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, isto é, células transfectadas com um construto de expressão contendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de

interesse. A expressão "células animais" engloba células de invertebrados, vertebrados não mamíferos (por exemplo, aves, répteis e anfíbios) e mamíferos. Exemplos não limitativos de células de invertebrados incluem as seguintes células de insetos: *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas), e *Bombyx mori* (bicho-da-seda / lagarta do bicho-da-seca).

10 Inúmeras linhagens de células de mamíferos são células hospedeiras adequadas para expressão recombinante de polipeptídios de interesse. Linhagens de células hospedeiras de mamíferos incluem, por exemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, 15 Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, células L, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murídeos (por exemplo, SP2/0 e NS0) e células C2C12, assim como linhagens de 20 células de primatas transformadas, hibridomas, células diplóides normais e cepas de células derivadas de cultura *in vitro* de tecido primário e explantas primários. Qualquer célula eucariótica que seja capaz de expressar o polipeptídio de interesse pode ser usada

nos métodos de projeto de meios apresentados. Há inúmeras linhagens celulares disponíveis em fontes comerciais, como a Coleção Americana de Cultura de Tipo (ATCC). Em uma modalidade da invenção, a cultura celular, por exemplo, a cultura celular em grande escala, emprega células de hibridoma. A construção de células de hibridoma produtoras de anticorpos é bem conhecida na técnica. Em uma modalidade da invenção, a cultura celular, por exemplo, a cultura celular em grande escala, emprega células CHO.

Alternativamente, pode ser possível produzir de maneira recombinante polipeptídios de interesse em eucariotos inferiores, como levedura, ou em procariotos, como bactérias. Cepas de leveduras adequadas incluem as cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida* ou qualquer cepa de levedura capaz de expressar o polipeptídio de interesse. Cepas bacterianas adequadas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ou qualquer cepa bacteriana capaz de expressar o polipeptídio de interesse. A expressão em bactérias pode resultar na formação de corpúsculos de inclusão incorporando a proteína recombinante. Assim, pode ser requerido o redobramento da proteína

recombinante para produzir material ativo ou mais ativo. São conhecidos na técnica vários métodos para a obtenção de proteínas heterólogas corretamente dobradas a partir de corpúsculos de inclusão bacterianos. Esses
5 métodos em geral envolvem a solubilização da proteína dos corpúsculos de inclusão, então, a desnaturação da proteína completamente usando-se um agente caotrópico. Quando há resíduos cisteína presentes na sequência de aminoácidos primária da proteína, frequentemente é
10 necessário realizar o redobramento em um ambiente que permita a formação correta de ligações dissulfeto (um sistema redox). Métodos genéricos de redobramento são apresentados em Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187-95, EP 0433225 e patente norte-americana nº 5.399.677.

15 A presente invenção usa construtos, na forma de plasmídios, vetores e cassetes de transcrição ou expressão, compostos por pelo menos um polinucleotídeo que codifique um polipeptídeo de interesse. Vetores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais
20 estejam operacionalmente ligados. Esses vetores são aqui chamados de "vetores de expressão recombinante" ou "vetores de expressão". Em geral, vetores de expressão utilizáveis em técnicas de DNA recombinante frequentemente estão na forma de plasmídios. No

presente relatório, "plasmídio" e "vetor" podem ser usados de maneira intercambiável, pois o plasmídio é a forma mais comum de vetor. Entretanto, a invenção pretende incluir outras formas de vetores de expressão

5 que sirvam a funções equivalentes, incluindo, mas não limitados a, vetores virais (por exemplo, retrovírus com defeitos de replicação, alfavírus modificados, adenovírus e vírus adeno-associados).

Construtos que são adequados para expressão

10 de proteínas em células animais são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os polinucleotídeos podem estar operacionalmente ligados a uma sequência de controle de expressão, como aquelas presentes nos vetores de expressão pMT2 ou pED apresentados, por exemplo, em

15 Kaufman et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485-90. Outras sequências de controle de expressão adequadas são encontradas em vetores conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a: HaloTag™ pHT2, pACT, pBIND, pCAT®3, pCI, phRG, phRL (Promega, Madison, WI);

20 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); Vetores pCMV-3Tag, Vetor pCMV-Script®, Vetores pCMV-Tag, Vetores pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA); pDNR-Dual,

pDNR-CMV (Clonetech, Palo Alto, CA); e pSMEDA (Wyeth, Madison, WI). Métodos genéricos de expressão de proteínas recombinantes também são conhecidos e são exemplificados, por exemplo, em Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:537-66.

Conforme aqui definido, "operacionalmente ligado" significa enzimática ou quimicamente ligado para formar uma ligação covalente entre o polinucleotídeo a ser expressão e a sequência de controle de expressão de maneira que a proteína codificada seja expressada pela célula hospedeira transfectada.

Os construtos de expressão recombinante da invenção podem ser portadores de sequências adicionais, como sequências reguladoras (por exemplo, sequências que regulem a replicação do vetor (por exemplo, origens de replicação, transcrição da sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo (ou peptídeo) de interesse) ou expressão do polipeptídeo codificado), sequências de etiqueta, como histidina, e genes marcadores selecionáveis. O termo "sequência reguladora" se destina a incluir promotores, intensificadores e quaisquer outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de

poliadenilação, sítios de splice de transcrição) que controlem a transcrição, replicação ou tradução. Essas sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990).
5 Aqueles versados na técnica reconhecerão que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, dependerá de vários fatores, incluindo a escolha da célula hospedeira e o nível de
10 expressão de proteína desejado. Sequências reguladoras preferidas para expressão de proteínas em células hospedeiras de mamíferos incluem elementos virais que dirigem elevados níveis de expressão de proteína, como promotores e/ou intensificadores derivados do promotor
15 FF-1a e BGH poli A, citomegalovírus (CMV) (por exemplo, o promotor/intensificador de CMV), vírus símio 40 (SV40) (por exemplo, o promotor/intensificador de SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio maior de adenovírus (AdMLP)) e polioma. Elementos reguladores
20 virais, e suas sequências, são descritos, por exemplo, nas patentes norte-americanas nº 5.168.062, 4.510.245 e 4.968.615, todas aqui incorporadas por referência em suas inteirezas.

Vetores adequados contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, sequências terminadoras, sequências de poliadenilação, sequências intensificadoras, genes marcadores e outras sequências conforme apropriado, podem ser escolhidas ou construídas. A expressão induzível de proteínas, conseguida com o uso de vetores com sequências promotoras induzíveis, como vetores induzíveis por tetraciclina, por exemplo, pTet-On™ e pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA), também pode ser usada no método apresentado. Para detalhes adicionais com relação a vetores de expressão, veja, por exemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2ª ed.) eds. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989). Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácidos nucléicos, por exemplo, na preparação de construtos de ácidos nucléicos, mutagênese, sequenciamento, introdução de DNA em células, expressão de gene e análise de proteínas, também são descritos em detalhes em *Current Protocols in Molecular Biology* (2ª ed.) eds. Ausubel et al., Wiley & Sons, Alameda, CA (1992).

Um polinucleotídeo inserido em um construto de expressão para a produção de um polipeptídeo de

interesse pode codificar qualquer polipeptídio que possa ser expressado na célula hospedeira usada na cultura celular. Assim, o polinucleotídeo pode codificar produtos de genes de comprimento total, partes de genes de comprimento total, peptídios ou proteínas de fusão. Esses polinucleotídeos podem consistir em DNA genômico ou cDNA e podem ser derivados de qualquer animal. Os polinucleotídeos podem ser isolados de células ou organismos por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, PCR ou RT-PCR, ou podem ser produzidos por métodos de síntese química convencionais conhecidos. Esses polinucleotídeos quimicamente sintéticos podem possuir propriedades biológicas em comum com polinucleotídeos naturais e, portanto, podem ser empregados como substitutos de polinucleotídeos naturais.

O polipeptídios também podem ser produzidos de maneira recombinante por ligação operacional do polinucleotídeo que codifica o polipeptídio de interesse a sequências de controle adequadas em um ou mais vetores de expressão em insetos, como vetores de baculovírus, e emprego de um sistema de expressão em células de insetos. Materiais e métodos sistemas de expressão baculovírus/Sf9 são comercialmente

disponíveis em forma de kit (por exemplo, o kit MAXBAC[®], Invitrogen, Carlsbad, CA).

A transfecção de células hospedeiras, por exemplo, células animais, com o construto de expressão pode ser conseguido por inúmeros métodos que são bem conhecidos na técnica. As células podem ser transitoriamente transfectadas ou transfectadas de maneira estável. Existem vários métodos diferentes bem estabelecidos para a distribuição de moléculas, particularmente ácidos nucleicos, a células hospedeiras, por exemplo, células animais. Dependendo do tipo de célula, a transfecção desejada (isto é, transitória ou estável) e das exigências experimentais específicas, como transfecção de linhagens celulares difíceis ou células primárias, do tipo de molécula transfectada (DNA genômico, DNA, oligonucleotídeos) ou do construto de expressão escolhido, cada método de transferência possui vantagens e desvantagens conhecidas por aqueles versados na técnica. Métodos de transfecção comuns incluem, por exemplo, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por lipossomos, transfecção mediada por DEAE Dextrano, pistolas de genes, eletroporação, distribuição de nanopartículas, poliaminas, episossomos e

polietileniminas. Além disso, há inúmeros kits e reagentes de transfecção comercialmente disponíveis em companhias como a Invitrogen (VOYAGER™, LIPOFECTIN®), EMD Biosciences, San Diego, CA (GENEJUICE™), Qiagen, 5 Germantown, MD (SUPERFECT™), Orbigen, San Diego, CA (SAPPHIRE™), e muitas outras conhecidas por aqueles versados na técnica. Protocolos de transfecção também podem ser encontrados em *Basic Methods in Molecular Biology* (2ª ed.) eds. Davis et al., Appleton e Lange, 10 CT (1994).

A presente invenção usa culturas celulares, por exemplo, culturas de células animais em grande escala, para produzir grandes quantidades do polipeptídeo de interesse. Métodos para transfecções 15 transitórias em grande escala são apresentados em *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. 20 (1988) *Bio/Technology* 6:1406-10; Baldi et al., *supra*; Lan Pham et al., *supra*; Meissner et al., *supra*; Durocher et al., *supra*). Em geral, a expressão transitória de genes em grande escala em culturas de células de mamíferos pode empregar qualquer um dos

vários tipos comuns de modos de transfecção, por exemplo, polietilenimina, pulso de campo elétrico, CALFECTION™ ou fosfato de cálcio, para se conseguir uma alta eficiência de transfecção nas escalas ou volumes desejados, por exemplo, mais de 10 litros (Derouazi et al., *supra*; Rols et al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206(1):115-21; Wurm e Bernard (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(2):156-59; Schlaeger e 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). Essas culturas em grande escala são geralmente cultivadas em biorreatores, agitadores ou incubadores com placas de agitação e também podem ser conhecidas como culturas "rotativas" ou "em suspensão". Assim, em oposição a transfecções tradicionais, em que as células são fixadas a placas ou frascos, os métodos apresentados em geral usam culturas em suspensão. Culturas celulares em grande escala em geral são consideradas culturas celulares que têm um volume de mais de cerca de 100 mL.

Em alguns casos, linhagens celulares que expressam o polipeptídeo de interesse podem ser primeiro produzidas e, então, usadas para semear uma cultura celular em grande escala. Linhagens celulares

estáveis que expressam uma proteína de interesse podem ser produzidas por vários métodos bem conhecidos, incluindo os métodos usados para a transfecção transitória aqui apresentada. Em geral, linhagens celulares estáveis são produzidas por crescimento de longo prazo e seleção em um meio quimicamente definido. Por exemplo, células transfectadas (por exemplo, por precipitação de fosfato de cálcio ou transfecção lipossômica) com um ácido nucléico que codifique um polipeptídeo de interesse podem ser concomitantemente transfectadas com um vetor portador de um gene de resistência à neomicina, que confere resistência a neomicina/geneticina (G418). As células transfectadas são, então, cultivadas em meio contendo G418, e as células sobreviventes são expandidas por clones para produzir uma linhagem celular de expressão estável. Aliquotas dessa linhagem celular podem ser, então, usadas para semear uma cultura em grande escala e para produzir grandes quantidades da proteína de interesse.

A transfecção de celular requer a otimização de inúmeras variáveis, incluindo a densidade de semeadura de células (por exemplo, de cerca de 1×10^5 a cerca de 3×10^6 células/mL de cultura), concentração de soro (por exemplo, 0-10%), temperatura de incubação

(por exemplo, cerca de 20-38°C), veículo ou reagente de transfecção (químico ou elétrico), volume da cultura (por exemplo, cerca de 5 mL-20 litros) e tempo de incubação (por exemplo, cerca de 24-144 horas). Para cada tipo de célula, os parâmetros ótimos variarão. Entretanto, os fornecedores comerciais em geral fornecem diretrizes de otimização para a transfecção de tipos de células particulares, assim como várias referências conhecidas por aqueles versados na técnica que utiliza a transfecção da célula hospedeira escolhida. Essas fontes podem ser usadas para dirigir a transfecção da célula hospedeira escolhida ou podem ser usadas como um ponto de partida a partir do qual se podem usar simples tentativas e erros para a obtenção de parâmetros ótimos de transfecção.

Cultura Celular

Procedimentos típicos para a produção de um polipeptídeo de interesse incluem culturas por bateladas e culturas por alimentação-bateladas. Processos de cultura por bateladas tradicionalmente compreendem a inoculação de uma cultura de produção em grande escala com uma cultura de semeadura de uma densidade celular particular, o cultivo das células sob condições que conduzam a crescimento e viabilidade

celular, a colheita da cultura quando as células atingirem uma densidade celular especificada e a purificação do polipeptídio expressado. Procedimentos de cultura por alimentação-bateladas incluem uma etapa ou etapas adicionais de suplementação da cultura por bateladas com nutrientes e outros componentes que sejam consumidos durante o crescimento das células. Aqueles versados na técnica reconhecerão que a presente invenção pode ser empregada em qualquer sistema em que células sejam cultivadas incluindo, mas não limitados a, sistemas de bateladas, alimentação-bateladas e perfusão. Em certas modalidades preferidas da presente invenção, as células são cultivadas em sistemas de alimentação-bateladas.

Um problemas persistente e não resolvido com culturas tradicionais, por exemplo, culturas por bateladas e por alimentação-bateladas, é a produção de refugos metabólicos, que têm efeitos prejudiciais sobre o crescimento celular, viabilidade e produção de polipeptídios expressados. Dois refugos metabólicos que têm efeitos particularmente prejudiciais são o lactato e amônio, que são produzidos como resultado do metabolismo da glicose e glutamina, respectivamente. Além da produção enzimática de amônio como resultado do

metabolismo da glutamina, o amônio também se acumular em culturas celulares como resultado da degradação não metabólica com o tempo.

Formulações de meios tradicionais, incluindo
5 meios comercialmente disponíveis como o Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificador por Dulbecco ([DMEM], Sigma), contêm níveis relativamente elevados de glicose e glutamina (este em comparação com outros
10 aminoácidos). Anteriormente, acreditava-se que esses componentes fossem requeridos em abundância, pois são as fontes de energia metabólica primárias para as células. Entretanto, o rápido consumo desses nutrientes leva ao acúmulo de lactato e amônio, conforme acima
15 descrito. Além disso, altos níveis iniciais de glicose e glutamina, e o subsequente acúmulo de lactato e amônio, resultam em alta osmolaridade, uma condição que, por sua vez, frequentemente é prejudicial para o crescimento celular, viabilidade celular e produção de
20 polipeptídeos. O meio racionalmente projetado aqui apresentado pode ser modificado para diminuir o acúmulo de produtos metabólicos prejudiciais. Essas modificações podem ser encontradas, por exemplo, nos Pedidos de Patentes Norte-americanas Publicados nº

2005/0070013 (alimentação restrita de glicose) e
2006/0121568 (modificações do teor e razões de
aminoácidos) (ambos são aqui incorporados por
referência em suas inteirezas).

5 Projeto Racional de Meios e Formulações

Formulações de meios tradicionais começam com
um nível relativamente baixo de aminoácidos totais em
comparação com as formulações de meios da presente
invenção. Por exemplo, DME-F12 (uma mistura a 50:50 de
10 meio de Eagle Modificado por Dulbecco e meio F12 de
Ham) tem um teor de aminoácidos totais de 7,29 mM, e o
meio de cultura celular tradicional conhecido como
RPMI-1640 tem um teor de aminoácidos totais de 6,44 mM
(veja, por exemplo, Morton (1970) *In Vitro* 6:89-108;
15 Ham (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53:288-93;
Moore et al. (1967) *J. Am. Medical Assn.* 199:519-24,
todos aqui incorporados por referência). Formulações de
meios mais recentes (como os meios apresentados no
Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº
20 2006/0121568) contêm níveis mais elevados de
aminoácidos e nutrientes. Formulações tradicionais,
entretanto, não se baseiam em exigências celulares
calculadas reais, que incluem o crescimento celular,
manutenção celular e, para culturas celulares usadas

para produzir polipeptídios recombinantes, exigências de produção. Usando essas variáveis, apresentam-se aqui métodos de determinação de formulações de meios com concentrações muito mais elevadas, e todavia não tóxicas, de aminoácidos totais.

As formulações de meios de cultura celular, por exemplo, as formulações de meios de cultura celular em grande escala, aqui descritas, quando usadas de acordo com, por exemplo, outras etapas de cultivo aqui descritas e com, por exemplo, modificações, como aquelas encontradas, por exemplo, no Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº 2006/0121568, otimizam a densidade celular e o título de polipeptídio. A concentração de aminoácidos das formulações de meios aqui descritas se baseiam em uma concentração do(s) aminoácido(s) requerida para: 1) massa celular; 2) manutenção celular; e 3) produção de polipeptídios. Em uma modalidade da invenção, um meio de cultura celular contém uma concentração do(s) aminoácido(s) que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do(s) aminoácido(s) que é calculada para uso na manutenção celular, e uma concentração do(s) aminoácido(s) que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse. Em outra modalidade da

invenção, um meio de cultura celular contém uma concentração, A, de um aminoácido que é representada pela fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é a concentração do aminoácido que é usada por unidade de massa celular, P é a concentração do aminoácido que é usada para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é o multiplicador para a massa celular desejada (isto é, as unidades de massa celular de pico desejadas), N é o multiplicador para a concentração desejada do polipeptídio de interesse (isto é, título de polipeptídio desejado ou de alvo), Y é o fator de manutenção celular; e F é um fator de linha basal.

A concentração, P, do aminoácido que é usada para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio na fórmula acima se baseia na estrutura primária da proteína recombinante, isto é, o teor de aminoácidos do polipeptídio. Assim, P variará com base no polipeptídio de interesse que deve ser produzido pela cultura celular em grande escala. P pode ser, então, convertido nas exigências de aminoácidos para a concentração do polipeptídio de interesse de alvo usando N, o multiplicador para a concentração do polipeptídio de interesse desejada

(isto é, título de polipeptídio desejado ou de alvo).
 Em alguns exemplos representativos da invenção abaixo,
 a unidade básica do título de polipeptídio é 1 g/L. Na
 Tabela 1, abaixo, que contém um cálculo representativo
 5 usando a fórmula aqui fornecido, a concentração de
 aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida
 para o polipeptídio de interesse a um título de 10 g/L
 (coluna 4) é determinada por multiplicação da
 concentração, P, de aminoácido requerida para 1 g/L
 10 (coluna 2) pelo multiplicador, N, em que $N=10$.

Tabela 1: Determinação representativa da
 concentração de aminoácido ajustada para a linha basal
 requerida para um título alvo de 10 g/L de anticorpo a
 uma massa celular desejada, em que a massa celular
 15 desejada é representada pela densidade celular de pico
 desejada 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) (Coluna 7 x F)
Amino ácido (AA)	Concentração de AA requerida para um título inicial de anticorpo de	Concentração de AA requerida para uma massa celular representada	Concentração total de AA requerida para um título alvo de anticorpo de 10 g/L	Concentração total de AA requerida para uma densidade celular de pico	Concentração total de AA requerida para manutenção celular (Y=100%) ou	Concentração total de Aa calculada requerida para o título alvo de anticorpo e	Concentração de AA ajustada à linha basal requerida para o título alvo

	1 g/L	por uma densidade celular de 10^6 células/mL	(N=10)	desejada de 15×10^6 células/mL (M=15)	(Y=1)	densidade celular de pico desejada	de anticorpo e densidade celular de pico desejada (F=1, 3)
			Coluna 2 x 10	Coluna 3 x 15	Coluna 5 x 100%	(Coluna 4+5+6)	Coluna 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	7,71	3,68	77,13	55,21	55,21	187,55	243,82

(mM)							
------	--	--	--	--	--	--	--

O multiplicador N pode ser calculado, por exemplo, por multiplicação da densidade de células viáveis integrada (IVC) pela produtividade específica (qp) de uma linhagem celular particular ($N = IVC \cdot qp$). Por exemplo, se a densidade de semeadura de uma linhagem celular particular for de $0,8 \times 10^6$ células/mL, a densidade celular no dia 6 e dia 10 é de 15×10^6 células/mL, e a densidade celular no dia 18 é de 11×10^6 células/mL (isto é, 73% do valor nos dias 6 e 15), então, $IVC = 211 \times 10^6$ (células/mL)*dia (isto é, $[(0,8+15)/2] \cdot 6$ dias + $[(15+15)/2] \cdot 4$ dias + $[(15+11)/2] \cdot 8$ dias). Se a produtividade específica média (qp) da linhagem celular escolhida for, por exemplo, de $47 \mu\text{g}/10^6$ células/dia, então, $N = 10$ g/L no dia 18 (isto é, 211×10^6 (células/mL)*dia $\times 47 \mu\text{g}/10^6$ células/dia). Aqueles versados na técnica perceberão que esses cálculos podem ser realizados com qualquer linhagem celular, ou que N pode ser estimado com base em características celulares e origem. Alternativamente, o multiplicador N não precisa ser calculado a partir de IVC e qp e pode ser simplesmente um título alvo razoável para uma cultura celular

particular. Um exemplo profético, que descreve o cálculo de IVC e qp, e a seleção adicional de valores de N e M razoáveis, é apresentado no Exemplo 5 (abaixo).

5 Conforme aqui usado, "massa celular",
"densidade celular" e outros se referem a uma coleção
de células. Por exemplo, uma massa celular pode se
referir a uma pelota celular. Conforme aqui usado,
"massa celular desejada" e outros se referem a uma
10 coleção de células, por exemplo, uma pelota celular,
que um praticante deseje obter em uma cultura celular.
Conforme aqui usado, "unidade de massa celular" e
outros refletem inúmeras maneiras de representar a
massa celular, por exemplo, número de células,
15 densidade celular, volume de células, volume de células
acondicionadas, peso seco das células e outras. Aqueles
versados na técnica saberão qual é a maneira mais
conveniente ou apropriada de representar uma unidade de
massa celular, e outras, para uma condição experimental
20 particular. Aqueles versados na técnica também
entenderão que, dependendo da unidade de massa celular,
M, o multiplicador para a massa celular desejada, isto
é, as unidades de massa celular de pico desejadas, será
representado pelos números de células d epico

desejados, densidade celular de pico desejada, volume de células de pico desejado, volume de células acondicionadas de pico desejado, peso seco de pico desejado e outros.

5 Em uma modalidade da invenção, a unidade de massa celular é representada pela densidade celular, e a massa celular desejada é representada pela densidade celular de pico desejada. Em outra modalidade, a unidade de massa celular é representada pelo peso ou
10 massa celular seca. A massa celular desidratada pode consistir essencialmente em todas as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos presentes na massa celular. Assim, a concentração, X , de um aminoácido pode ser experimentalmente determinada
15 primeiro centrifugando-se um número conhecido de células em uma pelota de células, secando-se a pelota de células e, subsequentemente, expondo-se a pelota seca a hidrólise ácida, lisando, dessa forma, as proteínas celulares da pelota de células em aminoácidos
20 individuais, que podem ser, então, quantificados por um analisador de aminoácidos (veja, por exemplo, o Exemplo 1). Isso fornece a concentração de aminoácidos, X , de um dado número de células, que pode ser, então, convertida nas exigências de aminoácidos para a

densidade celular de pico desejada usando-se M , o multiplicador para a densidade celular de pico desejada. Na Tabela 1, a concentração total de aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para a densidade celular de pico desejada de 15×10^6 células/mL (coluna 5) é determinada por multiplicação da concentração, X , do aminoácido requerida para 10^6 células/mL (coluna 3) pelo multiplicador, M , em que $M=15$. Assim, em alguns exemplos representativos da invenção, a unidade de massa celular é de 10^6 células/mL. Alternativamente, por exemplo, para um aminoácido sabidamente suscetível a degradação, a concentração, X , do aminoácido que é usada na fórmula acima pode ser determinada a partir de valores da literatura, por exemplo, Nyberg et al. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-35; Nadeau et al. (2000) *Metab. Eng.* 2:277-92; e Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318, ou dos métodos apresentados nessas publicações ou publicações similares conhecidas na técnica.

Quando o multiplicador M para a massa celular desejada é a densidade celular de pico desejada representada, M pode ser escolhido como, por exemplo, a densidade de pico de uma linhagem celular particular,

pela densidade em que a produtividade da linhagem celular é maximizada ou pela densidade prevista para a linhagem celular em um período de tempo particular com base na taxa de crescimento específica.

5 A concentração de aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para a manutenção celular, Y , é uma porcentagem da concentração de aminoácidos requerida para a massa celular desejada, por exemplo, densidade celular de pico desejada. Em uma

10 modalidade da invenção, as exigências de manutenção variam de 0% a 300% das exigências de massa celular desejada, o que fornece nutrientes suficientes para uso da célula sem risco de toxicidade induzida por nutrientes. Em outra modalidade da invenção, as

15 exigência de manutenção variam de 0% a 150% das exigências de massa celular desejadas, o que fornece nutrientes suficientes para uso da célula sem risco de toxicidade induzida por nutrientes. As exigências de manutenção aumentam quando aumenta a duração da cultura

20 (por exemplo, 100-150% de manutenção para um cultura de 21 dias). Na Tabela 1, a concentração de aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para a manutenção celular (coluna 6) é determinada por multiplicação da concentração de aminoácidos requerida

para a densidade celular de pico desejada (coluna 5) pelo fator de manutenção celular, Y, que, neste exemplo representativos é de 100%, para permitir um período de cultura prolongado. O fator de manutenção, Y, diferirá para diferentes células (e diferentes linhagens celulares), dependendo das demandas metabólicas únicas das células em cultura. Além disso, as exigências de manutenção para células em cultura também diferirão devido à variabilidade nos processos, por exemplo, densidade de inoculação, duração da cultura, tempo de alteração da temperatura e outros. Como diretriz inicial, pode-se fornecer, por exemplo, 0% de manutenção (diária) para culturas nos dias 0 a 5, 3% a 5% de manutenção (diária) para culturas nos dias 6 a 10, e 7% a 10% de manutenção (diária) para culturas nos dias 11 a 21. Para um processo com mais de 21 dias, as culturas may be provided 2% to 5% de manutenção (diária) for those additional dias. Aqueles versados na técnica perceberão que o ajuste do fator de manutenção, Y, para otimizar a densidade e o título é apenas uma questão de tentativa e erro de rotina. O ajuste da concentração de aminoácidos de acordo com as exigências de manutenção celular é importante para maiores viabilidade e produtividade da cultura celular e,

portanto, é um importante aspecto da presente invenção. Por exemplo, o ajuste da concentração de aminoácidos de acordo com as exigências de manutenção celular permite que uma cultura celular sustente uma maior densidade celular, viabilidade celular e produza um título de polipeptídios mais elevado (veja, por exemplo, o Exemplo 6).

Uma vez que as exigências de aminoácidos da:

- 1) massa celular (coluna 5); 2) manutenção celular
- 10 (coluna 6); e 3) produção de polipeptídios para o título alvo (coluna 4) desejadas sejam determinadas, pode-se obter a concentração total de aminoácidos calculada da cultura celular alvo. Na Tabela 1, a concentração total de aminoácidos calculada do meio de
- 15 cultura celular que é requerida para a cultura celular alvo (coluna 7) é determinada pela adição da concentração de aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para o polipeptídio de interesse a um título de 10 g/L (coluna 4) a concentração de
- 20 aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para a densidade celular de pico desejada de 15×10^6 células/mL (coluna 5), e a concentração de aminoácidos do meio de cultura celular que é requerida para um nível selecionado de manutenção celular (coluna 6).

Uma vez que a concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular que é requerida para a cultura celular alvo seja obtida conforme acima descrito, o valor é ajustado para uma
5 concentração de aminoácidos desejada para o meio de cultura celular, A, por um fator de linha basal, F, que garante a força de acionamento da transferência amino, por exemplo, os aminoácidos extra requeridos para a transferência de massa, os aminoácidos extra requeridos
10 para o transporte através da membrana celular e outros. Esse valor ajustado, A, é aqui chamado de "concentração de aminoácidos ajustada à linha basal" ou "concentração otimizada". A concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, representa a quantidade total
15 cumulativa de um aminoácido(s) que será distribuída à cultura, expressa com relação ao volume final da cultura, o que inclui o volume do meio de partida mais o volume de quaisquer alimentações para culturas por perfusão ou alimentação-bateladas. O ajuste da
20 concentração total de aminoácidos à concentração de aminoácidos ajustada à linha basal é um importante aspecto da invenção, porque permite uma maior viabilidade celular, densidade celular e títulos de polipeptídios (veja, por exemplo, Exemplo 6).

O fator de linha basal, F , que aumenta a concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular em até 200%, varia de 1 (0% de aumento) a 3 (200% de aumento). Em uma modalidade da invenção, a faixa para F está entre 1 e 1,5. Em outra modalidade da invenção, um valor de F abaixo de 1 pode ser compensado pela modificação da concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular (Tabela 1, coluna 7), o que pode ser conseguido por modificação da concentração de aminoácidos requerida para a massa celular desejada, a concentração de aminoácidos requerida para manutenção celular e/ou a concentração de aminoácidos requerida para incorporação no polipeptídio de interesse. Por exemplo, um fator de linha basal de 0,5 pode ser compensado pelo aumento da concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular, por exemplo, por um fator de dois (ou mais), que pode ser conseguido variando-se M , X , N , P e/ou Y . Na Tabela 1, a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A , do meio de cultura celular que é requerida para o título alvo e a densidade celular de pico desejada (coluna 8), é determinada por multiplicação da concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular (coluna 7), pelo

fator de linha basal, F , que, no exemplo representativos da Tabela 1, é de 1,3 (correspondendo a 30% de aumento com relação à concentração total de aminoácidos calculada do meio de cultura celular).

5 O m

O meio contendo a concentração ajustada à linha basal, A , de um aminoácido é aqui chamada de "meio de cultura celular desejado". Assim, o "meio de cultura celular desejado" representa um meio alvo que contém a concentração ajustada à linha basal, A . Esse meio compreende pelo menos uma concentração de aminoácidos determinada pela fórmula acima. De preferência, o meio de cultura celular desejado contém mais de uma concentração de aminoácidos determinada pela fórmula acima. Mais preferivelmente, o meio de cultura celular desejado contém pelo menos doze concentrações de aminoácidos ajustadas, por exemplo, uma concentração ajustada de arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina, determinadas pela fórmula acima. Aqueles versados na técnica entenderão que a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A , no meio de cultura celular desejado pode ser conseguida por qualquer número de

meios, incluindo, mas não limitados a, adição individual do(s) aminoácido(s), adição de peptona ou outros hidrolisados de proteína e/ou por adição de outro meio de cultura celular concentrado (por exemplo, 5 um meio de cultura celular de alimentação (ou mistura de meio, por exemplo, um meio em pó)) a um meio de cultura celular de partida (ou mistura de meio de cultura celular de partida, por exemplo, um meio em pó). Aqueles versados na técnica entenderão que a 10 adição de peptona (ou outro hidrolisado de proteína) pode ser determinada pelos teores de aminoácidos do produto de peptona particular de escolha ou pela determinação da concentração de aminoácidos fornecida por uma peptona particular, por exemplo, em geral, 5 15 g/L de peptona fornecer uma concentração de cerca de 40 mM a cerca de 50 mM de aminoácidos totais.

A concentração de aminoácidos no meio de cultura celular desejado está baseada em pelo menos uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, 20 determinada pela fórmula da invenção aqui apresentada; entretanto, essa concentração, assim como outras concentrações de aminoácidos no meio de cultura celular desejado, pode variar com relação à(s) concentração(ões) de aminoácidos ajustada(s) à linha

basal devido à influência de vários fatores. Por exemplo, certos aminoácidos podem ser produzidos durante o cultivo e, portanto, podem ser mantidos em um baixo nível. Outros aminoácidos podem variar com base em valores publicados (veja, por exemplo, Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº 2006/0121568). Além disso, alguns aminoácidos, por exemplo, metionina, podem ser consumidos em maior taxa por tipos celulares particulares e, portanto, devem ser adicionados em excesso. Ainda outros aminoácidos, como prolina, proporcionam uma força motriz para o crescimento celular e a produção de polipeptídios (veja Exemplo 4), e esses aminoácidos devem ser fornecidos, em alguns casos, em quantidade maior que a determinada pela fórmula da invenção acima. Além disso, pode-se modificar a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal se uma concentração obtida usando-se a fórmula acima for considerada tóxica (por exemplo, consideração dos níveis de serina, tirosina, metionina e valina). Está dentro do conhecimento daqueles versados na técnica, com a obtenção da concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de um aminoácido(s) para uso no meio de cultura celular desejado, variar a concentração de aminoácidos ajustada

à linha basal com base em fatores como os aqui indicados.

Componentes de meios adicionais, por exemplo, vitaminas, sais, glicose, elementos, podem ser calculados partir de (ou com base em) várias fontes, por exemplo, os Pedidos de Patentes Norte-americanas Publicados nº 2005/0070013 e 2006/0121568. Além disso, a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de um aminoácido obtida usando-se a fórmula acima pode ser modificada para fornecer uma razão particular com relação a outro aminoácido (por exemplo, a razão de glutamina para asparagina) ou para ficar dentro de uma concentração combinada desejada (por exemplo, a concentração combinada de glutamina e asparagina). Por exemplo, sabe-se que um meio de alta asparagina, baixa glutamina, combinado com alteração de temperatura, permite a captação de lactato, detoxificando, dessa forma, a cultura celular (Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº 2006/0121568). Assim, pode-se desejar modificar a concentração ajustada à linha basal, A, de glutamina e/ou asparagina, para se obter uma razão ótima.

Deve-se notar no exemplo representativo da Tabela 1 que a concentração combinada das concentrações

de aminoácidos ajustadas à linha basal para uso no meio de cultura celular desejado está alta, isto é, acima de 243 mM. Assim, apresenta-se aqui a descoberta de que uma alta concentração de aminoácidos pode ser usada em um meio de cultura celular desejado sem toxicidade ou prejuízo para o título se essa concentração se basear nas exigências de aminoácidos calculadas para uma densidade celular e título de polipeptídio alvo. Em uma modalidade da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 120 mM e cerca de 250 mM. Em outras modalidades, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura celular desejado é maior que cerca de 250 mM, por exemplo, de cerca de 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 ou 510 mM, ou qualquer valor intermediário.

A concentração ajustada à linha basal acima identificada, A, de um aminoácido que é usada em um meio de cultura celular desejado pode ser usada em culturas por bateladas, alimentação-batelada e perfusão. Quando usada em cultura por bateladas, a concentração do aminoácido inicial usada no meio de cultura celular desejado é a concentração de

aminoácidos ajustada à linha basal, A. Quando usada em culturas por alimentação-batelada ou perfusão, a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, representa a quantidade total cumulativa de um aminoácido(s) que será(ão) distribuído(s) à cultura, o que inclui o volume do meio de partida mais o volume de todas as alimentações. Assim, para culturas por alimentação-bateladas, que usam alimentações contínuas (por exemplo, alimentações nos dias 3-21) ou alimentações periódicas (por exemplo, alimentações a cada 2-3 dias), o meio de partida é manipulado para conter uma concentração de partida do aminoácido, B, de acordo com a fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, em que Z é a concentração do aminoácido no meio de cultura celular de alimentação, e V é o volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume de meio de cultura celular desejado. Um exemplo representativo dos cálculos requeridos para se obter a concentração de aminoácido de partida, B, é apresentado na Tabela 2, abaixo. Na Tabela 2, algumas concentrações de aminoácidos ajustadas à linha basal, A (coluna 2), são convertidas na concentração de aminoácido do meio de partida, B (coluna 5), com base em um volume de alimentação de 17% ($V=17\%$), e a concentração de

aminoácido do meio de alimentação, Z (coluna 4). Nesse exemplo, várias concentrações de aminoácidos ajustadas à linha basal, A (coluna 2), e concentrações de aminoácido de partida, B (coluna 5), são modificadas para os valores mostrados em negrito nas colunas 3 e 6. A modificação das concentrações de asparagina, ácido aspártico, glutamina e cisteína se baseou nas concentrações sugeridas pelo Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº 2006/0121568; a metionina foi ajustada em 50% para compensar seu consumo a uma quantidade mais elevada que a prevista; alanina, ácido glutâmico e glicina são produzidos pelas culturas (e, portanto, mantidos em um baixo nível); e as concentrações de serina, tirosina e valina foram diminuídas para níveis não tóxicos. Consequentemente, deve-se entender que a concentração de aminoácido de partida, B, pode se basear na concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, ou na concentração de aminoácidos ajustada à linha basal modificada.

Aqueles versados na técnica perceberão que o meio de alimentação usado para se obter o meio de cultura celular desejado durante um cultivo de células por alimentação-batelada e perfusão deve ser tão

altamente concentrado quanto possível, para evitar um transbordamento do recipiente em que se realiza a cultura out (por exemplo, um biorreator ou frasco de agitação) e para evitar a diluição dos componentes do meio. No exemplo apresentado na Tabela 2, um meio de alimentação preferido é designado como "Meio de Alimentação", e as concentrações de aminoácidos, Z, do Meio de Alimentação são apresentadas na coluna 4. Entretanto, pode-se usar qualquer meio de alimentação altamente concentrado ou qualquer método para fornecer aminoácidos altamente concentrados ao meio de cultura celular de partida, contando que concentração de aminoácidos ajustada à linha basal desejada, A, seja atingida no volume alvo. Esses métodos para fornecer aminoácidos altamente concentrados à cultura celular são comumente usados e bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

Aqueles versados na técnica compreenderão que a concentração de aminoácidos de partida, B, no meio de cultura celular de partida pode ser conseguida por qualquer número de meios, incluindo, mas não limitados a, adição individual do(s) aminoácido(s), adição de peptona e/ou outros hidrolisados de proteína, e/ou adição de outro meio de cultura concentrado (ou mistura

de meio, por exemplo, um meio em pó) ao meio de cultura celular de partida (ou mistura de meio de cultura celular de partida, por exemplo, um meio em pó). Aqueles versados na técnica também compreenderão que a

5 concentração de aminoácidos, Z, no meio de cultura celular de alimentação pode ser conseguida conseguida por qualquer número de meios, incluindo, mas não limitados a, adição individual do(s) aminoácido(s), adição de peptona e/ou outros hidrolisados de proteína,

10 e/ou adição de outro meio de cultura concentrado (ou mistura de meio, por exemplo, um meio em pó) ao meio de cultura celular de alimentação (ou mistura de meio de cultura celular de alimentação, por exemplo, um meio em pó).

15 Deve-se notar, no exemplo representativo da Tabela 2, que a concentração combinada de aminoácidos para uso no meio de cultura celular de partida é alta, isto é, acima de 125 mM. Assim, apresenta-se aqui a descoberta de que uma alta concentração de aminoácidos

20 pode ser usada sem toxicidade ou prejuízo do título em um meio de cultura celular de partida, se a concentração de aminoácidos de partida se basear nas exigências de aminoácidos calculadas para uma densidade celular de pico desejada e um título de polipeptídio

desejado. Em uma modalidade da invenção, a concentração combinada de aminoácidos está entre cerca de 70 mM e cerca de 510 mM. Em uma modalidade da invenção, a concentração combinada de aminoácidos está entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM. Em outra modalidade da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura celular de partida está entre cerca de 70 mM e cerca de 140 mM. Em outra modalidade da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura celular de partida é maior que cerca de 140 mM.

Tabela 2: Determinação representativa da concentração de aminoácidos de partida para um título alvo de 10 g/L de anticorpo, uma densidade celular de pico desejada de 15×10^6 células/mL e uma alimentação de 17%

1	2 (A)	3	4 (2)	5 (B)	6
Aminoácido (AA)	Concentração de AA ajustada à linha basal requerida para o título alvo e densidade celular de	Modificação da concentração de AA ajustada à linha basal requerida para o título alvo	Concentração de AA do meio de alimentação	Concentração de AA de partida requerida para o título alvo e densidade celular de pico	Concentração de AA de partida modificada requerida para o título alvo e densidade celular de

	pico desejada	e densidade celular de pico desejada		desejada (V=17%)	pico desejada
	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

Conforme mostrado na Tabela 3A e Tabela 3B, a determinação da concentração de aminoácidos ajustada à linha basal de um aminoácido, A, usada em um meio de

cultura celular desejado, e a determinação da concentração de aminoácido de partida, B, usada no meio de cultura celular de partida, podem ser calculadas para qualquer título de polipeptídio de alvo desejado e densidade celular de pico (alvo) desejada. A densidade celular de pico desejada da cultura em grande escala varia de cerca de 3 a cerca de 40×10^6 células/mL para culturas por alimentação-bateladas. Em uma modalidade da invenção, a densidade celular de pico desejada varia de cerca de 5 a cerca de 20×10^6 células/mL. O título alvo da cultura em grande escala varia de cerca de 3 a cerca de 25 g/L. Em ainda outra modalidade da invenção, o título alvo da cultura em grande escala varia de cerca de 5 a cerca de 20 g/L. Por exemplo, na Tabela 3, a densidade celular de pico desejada varia de 10 a 15×10^6 células/mL, e o título alvo varia de 3 a 10 g/L.

Tabela 3A: Exemplos representativos de concentrações de aminoácidos ajustadas à linha basal, A, para vários títulos alvo (conforme representado por um multiplicador para o título de polipeptídio alvo, N) e densidades celulares de pico desejadas (conforme representado por um multiplicador para a densidade celular de pico desejada, M).

A	N=10	N=5	N=3
---	------	-----	-----

	M=15	M=12,5	M=10
Concentração de aminoácidos	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

Tabela 3B: Exemplos representativos de concentrações de aminoácidos do meio de partida, B, para vários títulos alvo (conforme representado por um multiplicador para o título de polipeptídio alvo, N) e densidades celulares de pico desejadas (conforme

representado por um multiplicador para a densidade celular de pico desejada, M); as concentrações de aminoácido do meio de partida foram determinadas por subtração da alimentação e outras modificações das concentrações de aminoácidos ajustadas à linha basal

B	N=10 M=15	N=5 M=12,5	N=3 M=10
Aminoácido 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
-------	-------	------	-------

Usando-se a fórmula para determinar a(s) concentração(ões) de aminoácidos ajustada(s) à linha basal e para desenvolver formulações de meios de cultura celular desejados para produção em grande escala de polipeptídios, os inventores identificaram vários critérios que resultam em culturas celulares de alto título e alta densidade. Os critérios para produzir um título maior que 5 g/L, que são representados pelos valores mostrados na Tabela 4, incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: mais de ou igual a cerca de 3 mM de tirosina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de prolina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de valina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de leucina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de treonina; entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de lisina; uma concentração combinada de leucina, lisina, prolina, treonina e valina que esteja entre cerca de 35 mM e cerca de 150 mM; uma concentração combinada de leucina, lisina, treonina e valina que esteja entre cerca de 60% e cerca de 80% dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura celular desejado; uma

concentração combinada dos aminoácidos essenciais no meio de cultura celular desejado que esteja entre cerca de 30% e cerca de 50% dos aminoácidos totais no meio de cultura celular desejado; e/ou uma concentração combinada de aminoácidos totais entre cerca de 75 mM e cerca de 510 mM.

Tabela 4: Exemplos representativos do teor de aminoácidos e relações para meios racionalmente projetados para vários títulos alvo e densidades celulares de pico desejadas (conforme acima indicado, a unidade básica do título de polipeptídio é 1 g/L, e a unidade básica de massa celular é 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
Concentração	75,37	195,97	246,11	341,81	509,28
Total					
Essenciais	32,22	83,78	105,84	145,49	214,87
Totais					
Total em	21,39	55,61	71,37	95,46	137,61
Negrito					
Negrito/Essen	66%	66%	67%	66%	64%
ciais					
Negrito/Total	28%	28%	29%	28%	27%
Essenciais/To	43%	43%	43%	43%	42%
tal					

Na Tabela 4, os aminoácidos em negrito são valina, treonina, leucina e lisina, os aminoácidos em itálico são os aminoácidos essenciais (por exemplo, 5 arginina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, triptofano, treonina e valina; e para culturas celulares de CHO, a prolina também é um aminoácido essencial; aqueles versados na técnica

conhecem variações na definição de aminoácidos essenciais quando se aplica a diferentes células e outros). A Tabela 4 apresenta meios de cultura celular desejados representativos para células CHO a várias densidades celulares de alvo (M), títulos de alvo (N), exigências de manutenção celular (Y) e ajustes de linha basal (F).

Aqueles versados na técnica reconhecerão que os meios racionalmente projetados da invenção podem ser usados para produzir um polipeptídio de interesse ou podem ser usados em cultura celular que não se destine à produção de polipeptídios. Portanto, um meio racionalmente projetado pode ser usado nos métodos de cultura celular apresentados, por exemplo, para o crescimento, replicação e/ou manutenção eficientes de culturas celulares, por exemplo, culturas celulares em grande escala, que não contenham células hospedeiras manipuladas para produzir um polipeptídio de interesse exógeno, ou que não sejam cultivadas para produzir um polipeptídio de interesse endógeno. Nesse caso, o meio de cultura celular desejado não precisa levar em consideração o(s) aminoácido(s) requerido(s) para incorporação no polipeptídio de interesse e, ao invés, contém uma concentração(ões) de aminoácidos baseada na

concentração do(s) aminoácido(s) requerido(s) para: 1) massa celular desejada, e 2) manutenção celular. Esse meio de cultura celular desejado usado nos métodos de cultura celular apresentados contém uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, M é um multiplicador para uma massa celular de pico desejada (por exemplo, densidade celular de pico desejada e outras) da cultura celular, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal. Um meio de cultura celular desejado produzido de acordo com essa fórmula é, então, fornecido a uma cultura celular sob condições que permitam o crescimento e replicação das células na cultura celular. Em uma modalidade da invenção, o método de cultura celular usa uma cultura celular em grande escala. Em outra modalidade da invenção, o método de cultura celular usa células animais.

Adição de Prolina a Meios de Cultura Celular

Usando-se os métodos de projeto racional de meios aqui apresentados, determinou-se que a manutenção de altos níveis de prolina durante todo o período de cultivo da cultura celular, por exemplo, cultura

celular em grande escala, resulta em um título de polipeptídeo aumentado e uma densidade celular aumentada. Esse "limiar" de prolina varia de cerca de 1 mM a cerca de 2 mM, e um nível de prolina na cultura celular mantido acima desse limiar parece ser uma força motriz para a produção de culturas celulares em grande escala de alta densidade celular e alto título. De maneira interessante, o título de polipeptídeo e a viabilidade celular aumentados induzidos pela prolina aumentam concomitantemente as exigências da cultura por aminoácidos adicionais (para satisfazer a taxa de consumo aumentada), o que explica pelo menos parcialmente por que as presentes formulações de meios racionalmente projetadas contêm altas concentrações de aminoácidos.

Formação de uma Cultura Celular

Vários métodos de preparação de células de mamíferos para a produção de polipeptídios por cultura por bateladas e por alimentação-bateladas são bem conhecidos na técnica. Conforme acima descrito, um ácido nucléico suficiente para atingir expressão (tipicamente um vetor contendo o ácido nucléico que codifica o polipeptídeo de interesse e quaisquer elementos de controle genético operacionalmente

ligados) pode ser introduzido na linhagem de células hospedeiras por qualquer número de técnicas bem conhecidas. Tipicamente, as células são triadas para se determinar quais das células hospedeiras realmente captaram o vetor e expressam o polipeptídio ou proteína de interesse. Métodos tradicionais de detecção de um polipeptídio ou proteína de interesse particular expressado por células de mamíferos incluem, mas não se limitam a, imunoistoquímica, imunoprecipitação, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, SDS-PAGE, Western blots, ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), ensaios de atividade biológica e cromatografia de afinidade. Aqueles versados na técnica conhecerão outras técnicas apropriadas para a detecção de polipeptídios ou proteínas expressadas. Se múltiplas células hospedeiras expressarem o polipeptídio ou proteína de interesse, algumas das ou todas as técnicas relacionadas podem ser usadas para determinar quais das células expressam esse polipeptídio ou proteína nos níveis mais elevados.

Uma vez que uma célula que expresse o polipeptídio ou proteína de interesse tenha sido identificada, a célula é propagada em cultura por

qualquer um dos vários métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica. A célula que expressa o polipeptídeo ou proteína de interesse é tipicamente propagada por cultivo a uma temperatura e em um meio que conduza à sobrevivência, crescimento e viabilidade da célula. A cultura inicial pode ser de qualquer volume, mas frequentemente é de volume menor que o volume de cultura do biorreator de produção usado na produção final do polipeptídeo ou proteína de interesse, e frequentemente as células são submetidas a várias passagens em biorreatores de volumes crescentes antes de se semear o biorreator de produção. A cultura celular pode ser agitada ou sacudida para aumentar a oxigenação do meio e a dispersão de nutrientes para as células. Alternativamente ou além disso, dispositivos especiais de aspersão que são bem conhecidos na técnica podem ser usados para aumentar e controlar a oxigenação da cultura. De acordo com a presente invenção, aqueles versados na técnica compreenderão que pode ser benéfico controlar ou regular certas condições internas de uma cultura celular, incluindo, mas não limitadas a, pH (por exemplo, 6,6 a 7,6), temperatura (por exemplo, 25°C a 42°C), níveis de oxigênio e dióxido de carbono (por exemplo, O₂: 10% a 80% e CO₂: 7% a 15%, durante

toda a cultura) e osmolalidade (por exemplo, uma osmolalidade de partida de 260 a 340 mOsm/kg) e outras.

Conforme aqui usado, o termo "inóculo" é usado para se referir a um volume de células contendo o ácido nucléico que expressa o polipeptídio de interesse que é usado para semear o recipiente de produção no qual ocorrerá a cultura animal em grande escala, por exemplo, o biorreator de produção. Em uma modalidade da invenção, o volume de inóculo é de cerca de 60 a 80% do volume final.

A densidade celular de partida no biorreator de produção pode ser escolhida por aqueles versados na técnica. De acordo com a presente invenção, a densidade celular de partida no biorreator de produção pode ser tão baixa quanto uma única célula por volume de cultura. Em modalidades preferidas da presente invenção, as densidades celulares de partida no biorreator de produção podem variar de cerca de $0,1 \times 10^6$ células viáveis por mL a cerca de 10×10^6 células viáveis por mL e acima.

Culturas celulares iniciais e intermediárias podem ser cultivadas a qualquer densidade desejada antes de se semear o próximo biorreator de produção intermediário ou final. Em uma modalidade da invenção,

a densidade celular do inóculo é de cerca de $0,5-1 \times 10^6$ células/mL. É preferível que a maioria das células permaneçam vivas antes da semeadura, embora uma viabilidade total ou quase total não seja requerida. Em
5 uma modalidade da presente invenção, as células podem ser removidas do sobrenadante, por exemplo, por centrifugação a baixa velocidade. Também pode ser desejável lavar as células removidas com um meio antes de se semear o próximo biorreator, para remover
10 quaisquer refugos metabólicos ou componentes de meio indesejáveis. O meio pode ser o meio em que as células foram anteriormente cultivadas ou pode ser um meio diferente ou uma solução de lavagem selecionada por um praticante da presente invenção.

15 As células podem ser, então, diluídas na densidade apropriada para semeadura do biorreator de produção. As células podem ser diluídas em outro meio ou solução, por exemplo, o meio de cultura celular de partida ou o meio de cultura celular desejado,
20 dependendo das necessidades e desejos do praticante da presente invenção, ou para acomodar exigências particulares das próprias células (por exemplo, se as células tiverem de ser armazenadas durante um curto

período de tempo antes da semeadura do biorreator de produção).

Fase de Crescimento Inicial

Uma vez que o recipiente de produção seja
5 semeado conforme acima descrito, a cultura de células animais pode ser mantida na fase de crescimento inicial usando-se o meio de cultura celular desejado obtido pela fórmula da invenção aqui apresentada e sob condições que levem à sobrevivência, crescimento e
10 viabilidade da cultura celular. As condições precisas variarão dependendo do tipo de célula, do organismo do qual a célula foi derivada e da natureza e caráter do polipeptídio ou proteína expressada.

Um biorreator de produção pode ser de
15 qualquer volume que seja apropriado para produção em grande escala de polipeptídios ou proteínas. Em uma modalidade preferida, o volume do biorreator de produção é de pelo menos 500 litros. Em outras modalidades preferidas, o volume do biorreator de
20 produção é de 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros ou mais, ou qualquer volume intermediário. Aqueles versados na técnica conhecem, e são capazes de escolher, um biorreator adequado para uso na prática da presente invenção. O biorreator de

produção pode ser construído com qualquer material que leve ao crescimento celular e à viabilidade e que não interfira com a expressão ou estabilidade do polipeptídio ou proteína produzida.

5 A temperatura da cultura celular na fase de crescimento inicial será selecionada com base, principalmente, na faixa de temperaturas em que uma cultura celular permaneça viável. Por exemplo, durante a fase de crescimento inicial, células CHO crescem bem a 37°C. Em geral, a maioria das células de mamíferos crescem bem dentro de uma faixa de cerca de 35°C a 39°C. Em uma modalidade da invenção, a temperatura para a fase de crescimento (dia 0 a dia 3) é de 37°C, e a temperatura para a fase de produção (após o dia 3) é de 10 31°C. Aqueles versados na técnica serão capazes de selecionar uma temperatura ou temperaturas apropriadas em que as células cresçam, dependendo das necessidades das células e das exigências de produção do praticante.

15 Em uma modalidade da presente invenção, a temperatura da fase de crescimento inicial é mantida em uma única temperatura constante. Em outra modalidade, a temperatura da fase de crescimento inicial é mantida dentro de uma faixa de temperaturas. Por exemplo, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída de maneira 20

constante durante a fase de crescimento inicial. Alternativamente, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída por quantidades discretas em vários momentos durante a fase de crescimento inicial. Aquelles versados na técnica serão capazes de determinar se uma única temperatura ou múltiplas devem ser usadas, e se a temperatura deve ser ajustada de maneira constante ou por quantidades discretas.

As células podem ser cultivadas durante a fase de crescimento inicial durante uma maior ou menor quantidade de tempo, dependendo das necessidades do praticante e das exigências das próprias células. Em uma modalidade, as células são cultivadas durante um período de tempo suficiente para atingir uma densidade celular viável, que é uma dada porcentagem da densidade celular viável máxima que as células por fim atingiriam se pudessem crescer sem perturbações. Por exemplo, as células podem ser cultivadas durante um período de tempo suficiente para se atingir uma densidade celular viável desejada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 por cento ou mais da densidade celular viável máxima.

Em outra modalidade, deixa-se as células crescer durante um período de tempo definido. Por

exemplo, dependendo da concentração de partida da cultura celular, a temperatura em que as células são cultivadas e da taxa de crescimento intrínseca das células, as células podem ser cultivadas durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias. Em alguns casos, pode-se deixar que as células cresçam durante um mês ou mais. As células seriam cultivadas durante 0 dias no biorreator de produção se seu crescimento seu crescimento em um biorreator de semeadura, à temperatura da fase de crescimento inicial, fosse suficiente para que a densidade celular viável no biorreator de produção no momento da inoculação já estivesse na porcentagem desejada da densidade celular viável máxima. Os praticantes da presente invenção serão capazes de escolher a duração da fase de crescimento inicial dependendo das exigências de produção do polipeptídio ou proteína e das necessidades das próprias células.

20 A cultura celular pode ser agitada ou sacudida durante a fase de cultura inicial para aumentar a oxigenação e dispersão dos nutrientes para as células. De acordo com a presente invenção, aqueles versados na técnica entenderão que pode ser benéfico

controlar ou regular certas condições internas do biorreator durante a fase de crescimento inicial, incluindo, mas não limitadas a, pH, temperatura, oxigenação e outras. Por exemplo, o pH pode ser controlado por suprimento de uma quantidade apropriada de ácido ou base, e a oxigenação pode ser controlada com dispositivos de aspersão que são bem conhecidos na técnica.

Alteração das Condições da Cultura

10 Ao término da fase de crescimento inicial, a(s) condição(ões) da cultura podem ser alteradas, de modo que um segundo conjunto de condições de cultura seja aplicado, e ocorra uma alteração metabólica na cultura. O acúmulo de metabólitos inibidores, mais
15 notavelmente lactato e ammonia, inibe o crescimento. Uma alteração metabólica, realizada, por exemplo, por uma mudança na temperatura, pH, osmolalidade ou nível de indução química da cultura celular, pode se caracterizar, por exemplo, por uma redução na razão de
20 uma taxa de produção de lactato específica para uma taxa de consumo de glicose específica. EM uma modalidade não limitativa, as condições da cultura são alteradas por mudança da temperatura da cultura. Em outra modalidade da invenção, ocorre uma alteração da

temperatura nos dias 1-7. Em outra modalidade da invenção, a temperatura é alterada para 29°C - 32°C. Em outra modalidade da invenção, a alteração da temperatura ocorre no dia 3, e a temperatura é alterada para 31°C. Ensinamentos referentes à alteração da temperatura e à alteração metabólica podem ser encontrados na técnica (veja, por exemplo, Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº US 2006/0121568).

Fase de Produção Subsequente

10 Uma vez que as condições da cultura celular tenham sido alteradas conforme acima discutivo, a cultura celular pode ser mantido para uma fase de produção subsequente sob um segundo conjunto de condições de cultura que conduzam à sobrevivência e 15 viabilidade da cultura celular e apropriadas para expressão do polipeptídio ou proteína desejada, em níveis adequados, por exemplo, comercialmente adequados.

Conforme acima discutido, a cultura pode ser 20 alterada por alteração de uma ou mais de inúmeras condições de cultura incluindo, mas não limitadas a, temperatura, pH, osmolalidade e níveis de butirato de sódio. Em uma modalidade, altera-se a temperatura da cultura. De acordo com esta modalidade, durante a fase

de produção subsequente, a cultura é mantida em uma temperatura ou faixa de temperaturas que seja menor que a temperatura ou faixa de temperaturas da fase de crescimento inicial. Por exemplo, durante a fase de produção subsequente, células CHO expressam bem polipeptídios e proteínas recombinantes dentro de uma faixa de 25°C a 35°C. Em uma modalidade da invenção, a fase de produção começa depois do dia 3. Em outra modalidade da invenção, a fase de produção é realizada a 31°C. Conforme discutido no Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº US 2006/0121568, podem-se empregar múltiplas alterações discretas de temperatura para aumentar a densidade celular ou viabilidade ou para aumentar a expressão do polipeptídio ou proteína recombinante.

De acordo com a fórmula da presente invenção, a massa celular desejada (por exemplo, densidade celular) e o título de produção (por exemplo, título alvo) são selecionados para estabelecer a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, e a concentração de aminoácido de partida, B. Assim, em geral, as células são mantidas na fase de produção subsequente até atingir a densidade celular ou título de produção desejado, ou um valor(es) próximo da

densidade celular ou título de produção desejado. Em uma modalidade, as células são mantidas na fase de produção subsequente até que o título do polipeptídeo ou proteína recombinante atinja um máximo. Em outras modalidades, a cultura pode ser colhida antes desse ponto, dependendo das exigências de produção do praticante ou das necessidades ou viabilidade das próprias células. Por exemplo, as células podem ser mantidas durante um período de tempo suficiente para atingir uma densidade celular viável de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 por cento ou mais da densidade celular viável máxima. Em alguns casos, pode ser desejável permitir que a densidade celular viável atinja um máximo e, então, permitir que a densidade celular viável decline para algum nível antes da colheita da cultura. Em um exemplo extremo, pode ser desejável permitir que a densidade celular viável se aproxime de ou atinja zero antes da colheita da cultura.

Em outra modalidade da presente invenção, permite-se que as células cresçam durante um período de tempo definido durante a fase de produção subsequente. Por exemplo, dependendo da concentração da cultura celular no início da fase de crescimento subsequente,

da temperatura em que as células são cultivadas e da taxa de crescimento intrínseca das células, as células podem ser cultivadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias. Em alguns casos, pode-se permitir que as células cresçam durante um ou mais dias. Os praticantes da presente invenção serão capazes de escolher a duração da fase de produção subsequente, dependendo das exigências de produção de polipeptídeo ou proteína e das necessidades das próprias células. A duração da cultura ajudará a determinar a concentração de aminoácidos requerida para a manutenção celular, que pode variar, na presente invenção, de, por exemplo, 0% a 150% da concentração de aminoácidos requerida para a massa celular.

Em certos casos, pode ser benéfico ou necessário suplementar a cultura celular, isto é, alimentar a cultura celular, durante a fase de produção subsequente com nutrientes ou outros componentes de meio que tenham sido depletados ou metabolizados pelas células. Por exemplo, poderia ser vantajoso suplementar a cultura celular com nutrientes ou outros componentes de meio que se observou que foram depletados durante a monitorização da cultura celular (veja a seção

"Monitorização das Condições da Cultura Celular",
abaixo). Alternativamente ou além disso, pode ser
benéfico ou necessário suplementar a cultura celular
antes da fase de produção subsequente. Como exemplos
5 não limitativos, pode ser benéfico ou necessário
suplementar a cultura celular com hormônios e/ou outros
fatores de crescimento, íons particulares (como sódio,
cloreto, cálcio, magnésio e fosfato), tampões,
vitaminas, nucleosídeos ou nucleotídeos, elementos
10 residuais (compostos inorgânicos normalmente presentes
em concentrações finais muito baixas), lipídios,
aminoácidos ou glicose (ou outra fonte de energia).

Esses componentes suplementares podem ser
todos adicionados, isto é, alimentados, à cultura
15 celular de uma vez ou podem ser fornecidos à cultura
celular em uma série de adições. Em uma modalidade da
presente invenção, os componentes suplementares são
fornecidos à cultura celular em múltiplos momentos, em
quantidades proporcionais. Em outra modalidade, pode
20 ser desejável fornecer apenas alguns dos componentes
suplementares inicialmente, e fornecer os componentes
restantes em um momento posterior. Em ainda outra
modalidade da presente invenção, a cultura celular é

alimentada continuamente com esses componentes suplementares.

De acordo com a presente invenção, o volume total adicionado à cultura celular deve ser mantido, de maneira ótima, em uma quantidade mínima. Por exemplo, o volume total do meio de alimentação, ou solução contendo os componentes suplementares, adicionado à cultura celular pode ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50% do volume da cultura celular antes de se fornecerem os componentes suplementares. Assim, o meio de alimentação deve ser concentrado para evitar transbordamento do biorreator ou diluição do componente do meio. O meio de alimentação é fornecido, de preferência, à cultura principal com os mesmos pH, temperatura e outros, mas com altas concentrações de nutrientes com relação ao meio de partida. Em uma modalidade da invenção, o meio de alimentação é o meio de alimentação designado como "Meio de Alimentação" na coluna 4 da Tabela 2.

Em uma modalidade da invenção, a cultura celular com uma concentração de aminoácido de partida, B, é suplementada com aminoácido(s) adicional(ais), para se atingir uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A. Em outra modalidade da

invenção, a cultura celular recebe uma alimentação contínua aproximadamente a partir dos dias 3-21, ou alimentações periódicas a cada 2-3 dias. Em outra modalidade da invenção, a alimentação ocorre aproximadamente do dia 3 a aproximadamente o dia 20 (para uma cultura de 21 dias) como alimentações de bolo. Em outra modalidade da invenção, a alimentação ocorre como alimentações periódicas a cerca de cada 2-3 dias. Em ainda outra modalidade da invenção, o volume de alimentação é de cerca de 1% a cerca de 40% do volume total da cultura celular.

A cultura celular pode ser agitada ou sacudida durante a fase de produção subsequente, para aumentar a oxigenação e a dispersão de nutrientes para as células. De acordo com a presente invenção, aqueles versados na técnica entenderão que pode ser benéfico controlar ou regular certas condições internas do biorreator durante a fase de crescimento subsequente, incluindo, mas não limitadas a, pH, temperatura, oxigenação e outras. Por exemplo, o pH pode ser controlado por suprimento de uma quantidade apropriada de ácido ou base, e a oxigenação pode ser controlada com dispositivos de aspersão que são bem conhecidos na técnica.

Monitorização das Condições da Cultura Celular

Em certas modalidades da presente invenção, os praticantes podem achar benéfico ou necessário monitorizar periodicamente condições particulares da cultura celular em crescimento. A monitorização das condições da cultura celular permite que o praticante determine se a cultura celular está produzindo o polipeptídeo recombinante de interesse em níveis subótimos, ou se a cultura está prestes a entrar em uma fase de produção subótima. Para monitorizar certas condições da cultura celular, pode ser necessário remover pequenas alíquotas da cultura para análise. Aqueles versados na técnica entenderão que essa remoção pode potencialmente introduzir contaminação na cultura celular e tomarão cuidados apropriados para minimizar o risco dessa contaminação.

Como exemplos não limitativos, pode ser benéfico ou necessário monitorizar a temperatura, pH, densidade celular, viabilidade celular, densidade de células viáveis integrada, níveis de lactato, níveis de amônio, osmolaridade ou título do polipeptídeo expressado. Conhecem-se inúmeras técnicas que permitem àqueles versados na técnica medir essas condições. Por

exemplo, a densidade celular pode ser medida usando-se um hemacitômetro, um contador Coulter ou exame de densidade celular (CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). A densidade celular viável pode ser determinada por coloração de uma amostra de cultura com azul Trypan. Como apenas células mortas captam o azul Trypan (isto é, células viáveis excluem o corante), a densidade celular viável pode ser determinada por contagem do número total de células, dividindo-se o número de células que captaram o corante pelo número total de células, e tirando-se a recíproca. Pode-se usar HPLC para determinar os níveis de lactato, amônio ou polipeptídio ou proteína expressada. Alternativamente, o nível do polipeptídio ou proteína expressada pode ser determinado por técnicas padronizadas de biologia molecular, como coloração com Coomassie de géis de SDS-PAGE, Western blotting, ensaios Bradford, ensaios Lowry, ensaios de biureto e absorbância de UV. Também pode ser benéfico ou necessário monitorizar as modificações pós-tradução do polipeptídio ou proteína expressada, incluindo fosforilação e glicosilação.

Colheita dos Polipeptídios Produzidos por
Cultura Celular

O polipeptídio de interesse que é produzido pela cultura celular pode ser, então, purificado do meio de cultura ou de extratos celulares para uso em várias aplicações. Formas solúveis do polipeptídio
5 podem ser purificadas de meios condicionados. As formas ligadas a membrana do polipeptídio podem ser purificadas por preparação de uma fração de membrana total a partir da célula de expressão e extração das membranas com um detergente não iônico, como TRITON® X-
10 100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Proteínas citosólicas ou nucleares podem ser preparadas por lise das células hospedeiras (mediante força mecânica, bomba Parr, sonicação, detergente e outras), remoção da fração de membrana celular por centrifugação e retenção
15 do sobrenadante.

O polipeptídio pode ser purificado usando-se outros métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um polipeptídio produzido pelos métodos apresentados pode ser concentrado usando-se um
20 filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração AMICON® ou PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Após a etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz de purificação, como um meio de filtração

em gel. Alternativamente, pode-se empregar uma resina de troca de ânions (por exemplo, uma coluna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); essa resina contém uma matriz ou substrato com grupos dietilaminoetila (DEAE) ou polietilenimina (PEI) pendentes. As matrizes usadas para purificação podem ser acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos comumente empregados na purificação de proteínas. Alternativamente, pode-se usar uma etapa de troca de cátions para a purificação de proteínas. Trocadores de cátions adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfopropila ou carboximetila (por exemplo, colunas S-SEPHAROSE[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

15 A purificação do polipeptídio do sobrenadante da cultura também pode incluir uma ou mais etapas em coluna sobre resinas de afinidade, como concanavalina A-agarose, AF-HEPARIN650, heparin-TOYOPEARL[®] ou Cibacron azul 3GA SEPHAROSE[®] (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); colunas de cromatografia de interação hidrofóbica usando essas resinas como éter fenílico, éter butílico ou éter propílico; ou colunas de imunoafinidade usando anticorpos para a proteína marcada. Finalmente, uma ou mais etapas de

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), empregando meios de HPLC hidrofóbicos, por exemplo, sílica gel com grupos metila ou outros alifáticos pendentes (por exemplo, colunas Ni-NTA), podem ser empregadas para purificar ainda mais a proteína. Alternativamente, os polipeptídios podem ser expressados de maneira recombinante em uma forma que facilite a purificação. Por exemplo, os polipeptídios podem ser expressados como uma fusão com proteínas como proteína de ligação a maltose (MBP), glutathione-S-transferase (GST) ou tioredoxina (TRX). Kits para expressão e purificação de proteínas de fusão são comercialmente disponíveis no New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. As proteínas também podem ser etiquetadas com um pequeno epítipo (por exemplo, etiquetas His, myc ou Flag) e subsequentemente identificadas ou purificadas usando-se um anticorpo específico para o epítipo escolhido. Anticorpos para epítipos comuns são disponíveis em inúmeras fontes comerciais.

Como uma alternativa para os modos de purificação tradicionais por cromatografia (por exemplo, modos de purificação por cromatografia de

atravessamento de fluxo e de ligação de eluto), os polipeptídios produzidos pelos métodos da presente invenção podem ser purificados por operação de uma coluna de purificação por cromatografia em um modo de

5 partição fraca, uma técnica em que pelo menos um produto contido na preparação e pelo menos um contaminante ou impureza se ligam ambos a uma resina ou meio cromatográfico. No modo de partição fraca, a pelo menos uma impureza se liga mais firmemente ao meio do

10 que o produto polipeptídico; e, enquanto o carregamento (do fluido de carga) continua, o produto polipeptídico não ligado atravessa seletivamente o meio e é recuperado do efluente da coluna. Essa purificação resulta em um alto grau de redução de impurezas, assim

15 como elevada recuperação de produto. Essa purificação pode ser conseguida com meios e resinas conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitadas a, meio de troca de íons com carga, resina de cromatografia por interação hidrofóbica, resina de cromatografia por

20 afinidade com metal imobilizado e resina de hidroxiapatita. Em pelo menos uma modalidade, a remoção de impureza / contaminante sob condições de partição fraca ocorre quando o fluido de carga atravessa um meio / resina que se liga a pelo menos 2,8 mg de produto por

mL de meio / resina. Em pelo menos uma outra modalidade, a remoção de impureza / contaminante sob condições de partição fraca ocorre quando o fluido de carga atravessa um meio / resina nas condições operacionais definidas por um coeficiente de partição de pelo menos 0,1. O produto purificado é recuperado do efluente da coluna contendo o meio / resina.

A Tabela 5 resume as diferenças nas características entre os modos de atravessamento de fluxo (FT), ligação de eluto (B-E) e partição fraca (WP).

Tabela 5: Características dos Modos FT / WP / B-E			
	FT	WP	B-E
Kp	< 0,1	0,1-20	>20
Limitação de desafio de carga	Impurezas 10-50 mg de Prod/mL (típica), mas, na realidade, dependente da pureza da carga	Impurezas 50-500 mg de Prod/mL (típica), mas, na realidade, dependente da pureza da carga	Produto + impurezas < 100 mg de Prod/mL
Vol. de Carga,	Moderado, para impurezas diluídas 10-20 CVs	Muito alto, para impurezas diluídas up to 50 CVs	Menor, pois o produto se liga, além disso, a impurezas 5-20 CVs
[Produto] no eluato de carga	Igual à concentração da carga em muito da carga	Defasagem inicial, então, igual à concentração da carga em muito da carga	<5% da concentração da carga

Residual [Impureza]	Baixo	Muito baixo	Dependente das condições de eluição, volume reunido e capacidade
Produto ligado (Q)	< 1 mg/mL	< 10 - 20 mg/mL	> 10 - 20 mg/mL
Região operacional	Faixa de condições relativamente ampla	Janela de operação modesta entre os modos FT e B-E	Condições de ligação rigorosas para a carga, ampla faixa de condições de eluição
Fase(s) Móvel(eis)	Isocrática	Isocrática	Mudança na composição do tampão depois da carga que causa eluição

O coeficiente de partição (K_p) é a razão da concentração do produto adsorvido (Q) para a concentração do produto em solução (C); assim, o K_p para o modo de partição fraca é intermediário entre o K_p para os modos de atravessamento de fluxo e ligação de eluto, por exemplo, entre cerca de 0,1 e 20. Para se determinarem as condições apropriadas, por exemplo, sal, tampão, pH e outras, para um modo de partição fraca de purificação, pode-se realizar uma triagem de alta produção ou um estudo de triagem de purificação por bateladas. Assim, aqueles versados na técnica podem determinar coeficientes de partição de produto K_p como

uma função das condições operacionais (veja o Exemplo 7.1).

Métodos de purificação que usam um modo de partição fraca são descritos em detalhes nos Pedidos de Patentes Norte-americanas nº 11/372,054 e 11/510,634, ambos aqui incorporados por referência em suas inteirezas.

Algumas das ou todas as etapas de purificação acima, em várias combinações ou com outros métodos conhecidos, podem ser empregadas para purificar um polipeptídio de interesse produzido pelos métodos e meios de cultura de células animais em grande escala aqui descritos.

	Composições	Farmacêuticas	Contendo
15	Polipeptídios Produzidos por Cultura Celular		

Os meios de cultura celular precedentes, por exemplo, meios de cultura celular em grande escala, e métodos de cultivo de células fornecem polipeptídios de interesse, por exemplo, anticorpos, receptores solúveis, proteínas de fusão e outros. Os polipeptídios produzidos pelos métodos de cultura celular apresentados, e com os novos meios e métodos relacionados aqui apresentados, incluindo anticorpos e seus fragmentos, podem ser usados *in vitro*, *ex vivo* ou

incorporados em composições farmacêuticas e administrados a indivíduos (por exemplo, sujeitos humanos) necessitados. Várias abordagens farmacogenômicas a considerar na determinação de se um

5 polipeptídio da invenção deve ser administrado são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e incluem associação no genome, abordagem de gene candidato e perfilagem de expressão de gene. Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser

10 compatível com sua via de administração desejada (por exemplo, composições orais em geral incluem um diluente inerte ou um veículo comestível). Outros exemplos não limitativos de vias de administração incluem a administração parenteral (por exemplo, intravenosa),

15 intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (tópica), transmucosa e retal. Composições farmacêuticas compatíveis com cada via desejada são bem conhecidas na técnica.

Um polipeptídio da invenção pode ser usado

20 como uma composição farmacêutica quando combinado com um veículo farmacêuticamente aceitável. Essa composição pode conter, além de um polipeptídio da invenção, veículos, vários diluentes, cargas, sais, tampões, estabilizadores, solubilizadores e outros materiais bem

conhecidos na técnica. O termo "farmaceuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfira com a eficácia da atividade biológica do(s) ingrediente(s) ativo(s). As características do veículo
5 dependerão da via de administração.

A composição farmacêutica da invenção também pode conter fatores ou agentes terapêuticos adicionais para o tratamento de um transtorno alvo particular. Por exemplo, uma composição farmacêutica para tratamento de
10 diabetes do tipo 2 também pode incluir um agente antidiabético oral. A composição farmacêutica pode conter fatores trombolíticos ou antitrombóticos, como ativador de plasminogênio e Fator VIII. A composição farmacêutica também pode conter agentes
15 antiinflamatórios. Esses fatores e/ou agentes adicionais podem ser incluídos na composição farmacêutica para produzir um efeito sinérgico com um polipeptídeo da invenção ou para minimizar efeitos colaterais causados pelos polipeptídios da invenção.

20 A composição farmacêutica da invenção pode estar na forma de um lipossomo, em que um polipeptídeo da invenção é combinado, além de outros veículos farmaceuticamente aceitáveis, com agentes anfipáticos, como lipídios, que existem em forma agregada como

micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos ou camadas lamelares em solução aquosa. Lipídios adequados para formulação de lipossomo incluem, sem limitação, monoglicerídeos, diglicerídeos, sulfatidas, 5 lisolecitina, fosfolipídios, saponina, ácidos biliares e outros.

Conforme aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade total de cada componente ativo da composição ou método 10 farmacêutico que é suficiente para mostrar um benefício significativo para o paciente, por exemplo, melhora de sintomas, cura ou aumento da taxa de cura dessas condições. Quando aplicado a um ingrediente ativo individual, administrado isoladamente, o termo se 15 refere apenas a esse ingrediente. Quando aplicado a uma combinação, o termo se refere às quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, quer administrados em combinação, em série ou simultaneamente.

20 Na prática do método de tratamento ou uso da presente invenção, a quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo da invenção é administrada a um sujeito, por exemplo, um mamífero (por exemplo, um ser humano). Um polipeptídeo da invenção pode ser

administrado de acordo com o método da invenção isoladamente ou em combinação com outras terapias. Quando coadministrado com um ou mais agentes, um polipeptídeo da invenção pode ser administrado 5 simultaneamente com o segundo agente ou sequencialmente. Caso administrado sequencialmente, o médico encarregado decidirá quanto à sequência apropriada de administração dos polipeptídios da invenção em combinação com outros agentes.

10 Quando a quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo da invenção é administrada por via oral, o agente de ligação estará na forma de um comprimido, cápsula, pó, solução ou elixir. Quando administrada em forma de comprimido, a composição 15 farmacêutica da invenção também pode conter um veículo sólido, como uma gelatina ou um adjuvante. O comprimido, cápsula e pó contém de cerca de 5 a 95% de agente de ligação e, de preferência, de cerca de 25 a 90% de agente de ligação. Quando administrada em forma 20 líquida, pode-se adicionar um veículo líquido, como água, petróleo, óleos de origem animal ou vegetal, como óleo de amendoim (tomando-se cuidado com relação a alergias a amendoim), óleo mineral, óleo de soja ou óleo de gergelim, ou óleos sintéticos. A forma líquida

da composição farmacêutica também pode conter solução salina fisiológica, dextrose ou outras soluções de sacarídeos, ou glicóis, como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol. Quando administrada em
5 forma líquida, a composição farmacêutica contém de cerca de 0,5% a cerca de 90% em peso do agente de ligação e, de preferência, de cerca de 1% a cerca de 50% em peso do agente de ligação.

Quando a quantidade terapeuticamente eficaz
10 de um polipeptídio da invenção é administrada por injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, o polipeptídio da invenção estará na forma de uma solução aquosa livre de pirógenos, aceitável por via parenteral. A preparação dessas soluções de proteína
15 aceitáveis por via parenteral, com a devida atenção ao pH, isotonicidade, estabilidade e outros, está ao alcance daqueles versados na técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea deve conter, além do polipeptídio
20 da invenção, um veículo isotônico, como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de dextrose, injeção de dextrose e cloreto de sódio, injeção de Ringer lactato ou outro veículo conhecido na técnica. A composição farmacêutica da presente invenção

também pode conter estabilizadores, preservativos, tampões, antioxidantes ou qualquer outro aditivo conhecido por aqueles versados na técnica.

A quantidade de um polipeptídio da invenção em uma composição farmacêutica da presente invenção dependerá da natureza e gravidade da condição que está sendo tratada e da natureza de tratamentos anteriores a que o paciente tenha sido submetido. Por fim, o médico encarregado decidirá a quantidade de uma composição farmacêutica ou polipeptídio da invenção com a qual tratar cada paciente individual. Inicialmente, o médico encarregado administrará baixas doses de uma composição farmacêutica ou polipeptídio da invenção e observará a resposta do paciente. Doses maiores de uma composição farmacêutica ou polipeptídio da invenção podem ser administradas até se obter o efeito terapêutico ótimo e, nesse ponto, a dosagem em geral não é mais aumentada. Considera-se que as várias composições farmacêuticas usadas para tratar um sujeito necessitado devem conter de cerca de 0,1 μ g a cerca de 100 mg de um polipeptídio da invenção por kg de peso corporal.

A duração da terapia intravenosa (i.v.) usando uma composição farmacêutica da presente invenção variará dependendo da gravidade da doença que está

sendo tratada e da condição e resposta idiossincrática em potencial de cada paciente individual. Considera-se que a duração de cada aplicação de uma composição farmacêutica ou um polipeptídio da presente invenção pode estar dentro da faixa de, por exemplo, 1-12, 6-18, ou 12-24 h de administração i.v. contínua ou intermitente. Também se considera a terapia subcutânea (s.c.) usando uma composição farmacêutica da presente invenção. Essas terapias podem ser administradas diariamente, semanalmente ou, mais preferivelmente, bissemanalmente ou mensalmente. Por fim, o médico encarregado decidirá quanto à duração apropriada da terapia i.v. ou s.c., ou da terapia com uma molécula menor, e ao cronograma de administração da terapia usando a composição farmacêutica da presente invenção.

Todas as referências, patentes, pedidos de patente e publicações citadas neste pedido são aqui incorporadas por referência em suas inteirezas.

EXEMPLOS

Os Exemplos a seguir são apresentados para auxiliar no entendimento da invenção, mas não pretendem limitar de forma alguma o âmbito da invenção e não devem ser assim tomados. Os Exemplos não incluem descrições detalhadas de métodos convencionais, como

técnicas de DNA recombinante. Esses métodos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

Exemplo 1

Quantificação da Composição de Aminoácidos de

5 Células CHO

Para quantificar a composição de aminoácidos de células CHO que expressam anticorpos e células CHO que expressam proteína recombinante, isto é, a porcentagem molar de cada aminoácido com relação aos
10 aminoácidos totais da massa celular (biomassa), realizou-se o seguinte procedimento. Resumidamente, três linhagens de células CHO que superexpressam anticorpos ou proteína recombinante, mais especificamente anticorpo anti-IL-22 (anticorpo anti-
15 IL-22 humano recombinate), anticorpo Myo-029 (anticorpo monoclonal IgG1anti-GDF8) e BMP-2 humano recombinante, foram cultivadas em um frasco de agitação durante um (BMP-2) ou três (Myo-029 e anti-IL-22) dias. No último dia, as culturas foram colhidas, e as células
20 centrifugadas a uma concentração de 10^6 células/mL. Uma pelota contendo 10^6 células foi lavada duas vezes com 1 X PBS, e a pelota foi novamente posta em suspensão em 500 μ L de HCl a 5 N. A suspensão contendo células foi aquecida a 100°C durante 24 horas, quando a suspensão

foi centrifugada a vácuo. A pelota resultante foi novamente posta em suspensão em 500 μ L de PBS, e a análise de aminoácidos foi realizada usando-se cromatografia gasosa ou líquida.

5 A hidrólise ácida determinou que tanto a metionina, quanto o triptofano se degradam durante a hidrólise ácida; assim, as concentrações desses aminoácidos nos Exemplos 2 e 3 se basearam em valores da literatura para células CHO. Além disso, determinou-se que a glutamina e a asparagina eram convertidas em suas formas ácidas, ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente, durante a hidrólise; assim, as concentrações para esses quatro aminoácidos nos Exemplos 2 e 3 foram ajustadas com base nas razões de glutamina / ácido glutâmico e asparagina / ácido aspártico relatadas na literatura. De outra forma, determinou-se que essas linhagens de células CHO possuem composições de aminoácidos similares, que correspondem intimamente aos valores relatados para
10
15
20 outras células de mamíferos (dados não mostrados) (veja Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318).

Exemplo 2

Densidade celular de pico desejada de 15×10^6 células/mL e título alvo de anticorpo anti-IL-22 de

9 g/L em células CHO (Linhagem Celular 1) com 32% de volume de alimentação usando meio racionalmente projetado

Exemplo 2.1: Meio Racionalmente Projetado

5 Usando-se a fórmula aqui apresentada, determinou-se a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de aminoácidos requerida para que 15×10^6 células/mL produzam 9 g/L de anticorpo anti-IL-22 na Linhagem Celular 1 de CHO (Tabela 6, coluna 2) (a
10 manutenção celular foi estabelecida em 50%, isto é, $Y=0,5$). A concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A (Tabela 6, coluna 2), de vários aminoácidos foi ajustada para se obterem as concentrações de aminoácidos totais ajustadas à linha basal modificadas
15 mostradas na coluna 3 da Tabela 6. Foram feitos os seguintes ajustes: 1) os níveis de Asn, Asp, e Gln foram estabelecidos de acordo com Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº US2006/0121568A1; 2) como Ala, Glu, Gly eram produzidos pelas culturas celulares,
20 seus níveis foram ajustados em valores mais baixos; 3) o nível de Cys foi ajustado devido ao fato de a cisteína também ser usada no meio de alimentação, e o valor de cisteína do meio é estabelecido como o do Pedido de Patente Norte-americana Publicado nº

US2006/0121568A1; 4) os níveis de Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe são 20% a 100% maiores que a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, devido ao fato de a alimentação em pó, que contém uma composição de aminoácidos estabelecida, ser usada para preparar o meio de cultura celular desejado, de modo que uma correspondência exata não foi possível. A concentração de aminoácidos do meio de partida, B (Tabela 6, coluna 4), foi calculada a partir das concentrações de aminoácidos totais ajustadas à linha basal modificadas mostradas na coluna 3 da Tabela 6.

Tabela 6: Formulação do Meio de Cultura Celular Desejado

Aminoácido	Concentração de aminoácidos ajustada à linha basal (mM) (A)	Concentração de aminoácidos ajustada à linha basal modificada (mM)	Concentração de aminoácidos 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

Exemplo 2.2: Densidade celular e título de anticorpo em resposta a meio racionalmente projetado

Células da linhagem celular 1 (células CHO
 5 que expressam anti-IL-22) foram obtidas em frascos de
 agitação contendo culturas do dia 3 e foram inoculadas
 a $0,7 \times 10^6$ células/mL no dia 0 no meio de cultura
 celular de partida em um biorreator de 1 L (Applikon
 2L, (Applikon Inc, Foster City, CA)). No dia 3 (cerca
 10 de 80 horas), a temperatura foi alterada de 37°C para
 31°C, e se adicionou Meio de Alimentação (veja coluna 4
 da Tabela 2) a 3,75%, 4%, 4%, 9%, 2%, 1%, 1%, 1%, 3%,
 2% e 1% em volume nos dias 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13,
 14, 17, 20, respectivamente, para se obter o meio de
 15 cultura celular desejado, que contém a concentração de

aminoácidos mostrada na Tabela 6, coluna 3. As culturas celulares foram mantidas a pH 7,0, em um nível de oxigênio dissolvido de 30%, e com agitação a 200 rpm. Retiraram-se amostras diariamente para testar a
5 densidade celular (instrumento de contagem de células CEDEX ® (Innovatis, Malvern, PA)), viabilidade (CEDEX ®) e níveis de certos metabólitos (Nova BioProfile Analyzer, Nova Biomedical Cooperation, Waltham, MA). Meios centrifugados foram armazenados a -80°C para
10 análise do título de anticorpo usando HPLC de Proteína A.

Os resultados são mostrados nas Figuras 1 e 2. Como se pode observar na Figura 1, a maior densidade celular (cerca de 11×10^6 células/mL) foi atingida no
15 dia 11 da cultura, com a densidade celular diminuindo depois disso. O título de anticorpo do meio (cerca de 7 g/L) foi obtido no dia 21 da cultura. Assim, o meio racionalmente projetado pode ser usado para produzir alta densidade celular e alto título de anticorpo.

20 Exemplo 3

Densidade de pico desejada de 15×10^6 células/mL e título de anticorpo anti-IL-22 alvo de 10 g/L em células CHO (Linhagem Celular 2) com 33% de

volume de alimentação usando meio racionalmente projetado

Exemplo 3.1: Meio Racionalmente Projetado

Usando-se a fórmula aqui apresentada, determinou-se a concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de aminoácidos requerida para 15×10^6 células/mL e 10 g/L de anticorpo anti-IL-22 (descrito acima) (a manutenção celular foi estabelecida em 50%, isto é, $Y=0,5$). A concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A (Tabela 7, coluna 2) de vários aminoácidos foi ajustada conforme descrito no Exemplo 2 para se obterem as concentrações de aminoácidos totais ajustadas à linha basal modificadas mostradas na coluna 3 da Tabela 7. Além disso, para essa formulação de meio tanto o meio de cultura celular de partida, quanto o Meio de Alimentação foram preparados a partir de pós existentes com composições fixas, e, portanto, não foi possível uma correspondência exata. A concentração de aminoácidos do meio de partida, B (Tabela 7, coluna 4), foi calculada a partir das concentrações de aminoácidos totais ajustadas à linha basal modificadas mostradas na coluna 3 da Tabela 7.

Tabela 7: Formulação do meio de cultura celular desejado

Aminoácido	Concentração de aminoácidos ajustada à linha basal (mM) (A)	Concentração de aminoácidos ajustada à linha basal modificada (mM)	Concentração de aminoácidos 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

Exemplo 3.2: Densidade celular e título de anticorpo em resposta ao meio racionalmente projetado

Células da linhagem celular 2 (células CHO que expressam anti-IL-22) foram obtidas em frascos de agitação contendo culturas do dia 3, e as células foram inoculadas a $0,7 \times 10^6$ células/mL no dia 0 no meio de cultura celular de partida em um biorreator de 1 L (Applikon 2L). No dia 3 (cerca de 80 horas), a temperatura foi alterada de 37°C para 31°C, e a alimentação foi adicionada continuamente (1,8% em volume por dia) com uma bomba de alimentação automática, para se obter o meio de cultura celular desejado, que contém a concentração de aminoácidos mostrada na Tabela 7, coluna 3. As culturas celulares foram mantidas a pH 7,0, em um nível de oxigênio dissolvido de 30%, e com agitação a 200 rpm. Retiraram-se amostras diariamente para testar a densidade celular (instrumento de contagem de células CEDEX ®), viabilidade (CEDEX ®) e os níveis de certos metabólitos (analisador Nova Enzymatic). Meios centrifugados foram armazenados a -80°C para análise do título de anticorpo usando HPLC de Proteína A.

Os resultados são mostrados nas Figuras 3 e 4. Como se pode observar na Figura 3, a maior densidade celular (mais de 12×10^6 células/mL) foi atingida no dia 10 da cultura, com a densidade celular diminuindo

depois disso. O título de anticorpo do meio (mais de 10 g/L) foi obtido no dia 19 da cultura. Assim, o meio racionalmente projetado pode ser usado para produzir alta densidade celular e alto título de anticorpo.

5 Exemplo 4

Efeito da adição de prolina sobre o desempenho da cultura celular

Células CHO que produzem o anticorpo Anti-IL-22 foram cultivadas em frascos de agitação de pH controlado (frascos de 500 mL com 100 mL de volume de trabalho) e mantidas no agitador a ~100 rpm em um incubador de temperatura controlada, a 7% de CO₂. As células foram semeadas a $0,7 \times 10^6$ células/mL. A duração da cultura foi de 18 dias. As células dos primeiros 3 dias foram mantidas a 37°C, após o que a temperatura foi alterada para 31°C no restante da cultura. O pH foi controlado nos primeiros 3 dias com bicarbonato de sódio a 1 M. O meio de cultura celular consistia em um meio baseado em exigências de cultura celular tradicionais, chamado de "Meio Tradicional", e meio racionalmente projetado, isto é, meio formulado usando-se o projeto racional aqui apresentado, chamado de "Meio de Projeto Racional", para atingir 10×10^6 células/mL e 10 g/L de anticorpo. A principal diferença

digna de nota entre essas duas formulações é que vários aminoácidos (PRO, THR, GLY, TYR, TRP, VAL, e PHE) estão em maiores concentrações no "Meio de Projeto Racional", em comparação com o "Meio Tradicional". Uma terceira condição apresentada é o Meio Tradicional com mais 3,7 mM de prolina adicionada para se obter o nível de prolina no "Meio de Projeto Racional", chamado de "Meio Tradicional + Prolina". Essas formulações são apresentadas na Tabela 8, abaixo. Meio de Alimentação próprio da Wyeth ("Meio de Alimentação", veja a Tabela 2) foi adicionado à cultura a 23% no total em volume, compreendendo alimentações diárias de 2% nos dias 3-4, 9-14, 17, 1% nos dias 5-6, e 3% no dia 7.

Tabela 8: Formulações de meios para estudos de prolina

1	2	3	4
Aminoácido	Meio Tradicional [mM]	Meio de Projeto Racional [mM]	Meio 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
triptofano	1,54	2,32	1,54
tirosina•2Na	3,34	5,13	3,34
valina	7,36	10,30	7,36

Os resultados desses experimentos são mostrados nas Figuras 5-7. A adição de prolina ao Meio Tradicional, isto é, "Meio Tradicional + Prolina" (Figura 5), resultou em uma produção de anticorpo equivalente ao "Meio de Projeto Racional" até o dia 14. Conforme mostrado na Figura 6, todos os três meios mantiveram uma alta densidade celular, com a maior densidade apresentada no dia 12. Conforme mostrado na Figura 7, todos os três meios mantiveram alta viabilidade celular, com as culturas em "Meio de Projeto Racional" mantendo maior viabilidade nos dias 15-18, em comparação com as culturas contendo "Meio Tradicional" e "Meio Tradicional + Prolina". Como vários outros meios, que continham cada um uma concentração racionalmente projetada de glicina,

fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina ou valina, não resultaram em culturas celulares produtoras de um maior título de anticorpo do que o "Meio Tradicional" (dados não mostrados), a prolina serve de aminoácido limitador de taxa requerido para se atingir um alto título. Isso é exemplificado nas Figuras 8A-E, que mostram que, até o dia 14, muitos dos aminoácidos no "Meio Tradicional + Prolina" atingiram níveis extremamente baixos (deve-se notar que a tirosina foi depletada), evitando, dessa forma, a incorporação adicional desses aminoácidos no anticorpo. Esse resultado também é observado no gráfico de título (Figura 5), pois a inclinação para o "Meio Tradicional + Prolina" é reduzida após o dia 14, ao passo que a produção de anticorpo é mantida até o dia 18 para o "Meio de Projeto Racional", que contém níveis mais elevados de outros aminoácidos.

De maneira interessante, a concentração de prolina no "Meio Tradicional" nunca caiu abaixo de 1 mM (Figura 8A); entretanto, o efeito da prolina sobre a incorporação global de aminoácidos no anticorpo foi reduzido após o dia 11. Esse achado sugere que existe um limiar de prolina, isto é, a concentração de prolina

tem de ser mantida acima de 1 mM durante toda a cultura.

Exemplo 5

Exemplo Profético: Meios de cultura celular
5 otimizados para uma nova linhagem celular

Os métodos de projeto de meios aqui apresentados podem ser usados para qualquer cultura celular, incluindo culturas celulares que usam novas células / linhagens celulares. Os meios otimizados para
10 uso com uma nova linhagem celular conteriam pelo menos uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de um aminoácido de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$.

Um multiplicador, M, quando se aplica a
15 equação acima a uma nova cultura celular, pode ser selecionado, por exemplo, de 1 a 20×10^6 células/mL. Aqueles versados na técnica seriam capazes de calcular um valor de M utilizável dobrando a densidade celular máxima durante a fase de crescimento, que pode ser
20 caculado com base na taxa de crescimento.

Um multiplicador, N, quando se aplica a equação acima a uma nova cultura celular, pode ser calculado, por exemplo, por multiplicação da IVC pela qp celular. Aqueles versados na técnica seriam capazes

de calcular a IVC por estimativa do perfil de crescimento, seguindo os métodos descritos na seção intitulada "Projeto Racional de Meios e Formulações". Aqueles versados na técnica seriam capazes de calcular a qp por medição da produção de anticorpo ou produto de proteína recombinante por célula..

Um fator de manutenção celular, Y, quando se aplica a equação acima a uma nova cultura celular, pode ser estimado usando-se $Y=1$ (isto é, 100% do(s) aminoácido(s) requerido(s) para a massa celular desejada) inicialmente e, então, refinando-se o valor de Y (maior ou menor).

Um fator de linha basal, F, quando se aplica a equação acima a uma nova cultura celular, pode ser estimado usando-se $F=1,3$ (isto é, 30% a mais de aminoácido(s)) inicialmente e, então, refinando-se o valor de F (maior ou menor).

Exemplo 6

Efeito dos fatores de manutenção e de linha basal sobre o desempenho da cultura celular

Para demonstrar que o fator de manutenção, Y, e o fator de linha basal, F, são importantes / essenciais para o desempenho da cultura celular, células CHO que expressam anti-IL-22 foram semeadas a

0,7 x 10⁶ células/mL e cultivadas durante 21 dias em biorreatores de 2 L, com um pH estabelecido em 7,0 e um oxigênio dissolvido (DO) estabelecido em 30%. O pH foi controlado por Na₂CO₃/NaHCO₃ a 2N, e o DO foi controlado com a aspersão de ar (contendo 7% de CO₂). A temperatura da cultura foi de 37°C nos 3 primeiros dias e foi alterada para 31°C após o dia 3, e permaneceu em 31°C até o fim da cultura. As células foram cultivadas durante 21 dias em (1) meios contendo aminoácidos requeridos tanto para o título alvo de proteína, quanto para a densidade celular de pico desejada (mas não levando em consideração o fator de manutenção ou o fator de linha basal), isto é, "Meio de Projeto Racional sem fatores de manutenção e basais" ou (2) "Meio de Projeto Racional."

Conforme exemplificado nas Figuras 9 e 10, o meio que não leva em consideração os fatores de manutenção e de linha basal apresentou uma diminuição significativa na viabilidade, chegando a quase 0% no dia 21 da cultura celular, e uma diminuição significativa na densidade celular. Além disso, a Figura 11 demonstra que, no dia 21 da cultura celular, esse mesmo meio só era capaz de sustentar um título de anticorpo de 5 g/L.

Em contraste, o Meio de Projeto Racional (incluindo os fatores de manutenção e de linha basal) apresentou maiores viabilidade, densidade celular e títulos de anticorpo (Figuras 9-11). No dia 21 da cultura celular, o Meio de Projeto Racional foi capaz de sustentar um título de anticorpo de 10 g/L.

Esses achados sugerem que levar em conta fatores de manutenção e de linha basal na determinação da concentração de aminoácidos no meio de cultura celular desejado melhora o desempenho das células, conforme medido por viabilidade celular, densidade celular e título de polipeptídio.

Exemplo 7

Purificação de polipeptídio usando cromatografia de troca de ânions em um modo de partição fraca

Exemplo 7.1. Triagem de alta produção para estabelecer as condições de partição fraca e de atravessamento de fluxo

Realizou-se primeiro um estudo de triagem inicial, que determinou o coeficiente de partição e/ou a concentração de produto ligado à resina sob várias condições de solução, definindo, assim, as regiões operacionais dos modos de partição fraca (WP) e de

fluxo de atravessamento (FT) para Mab-AAB, o polipeptídio de interesse, e Meio TMAE-HiCap (M). Essa triagem variou a concentração de cloreto de sódio e o pH para determinar seus efeitos sobre a extensão de
5 ligação de Mab-AAB e impurezas relacionadas ao processo (Proteína A e HCP) ao meio TMAE.

Os níveis de Proteína A residuais nas amostras de teste foram medidos usando-se um ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) de Proteína A. A
10 quantidade de agregado de alto peso molecular foi medida usando-se um ensaio de cromatografia de exclusão de tamanho analítica (SEC). Os níveis de proteínas da célula hospedeira (HCPs) foram medidos usando-se um ELISA de HCP. Todos os estudos de triagem e coluna
15 foram conduzidos à temperatura ambiente.

Cinquenta μ L de meio TMAE HiCap foram adicionados a cada poço de uma placa de filtro de 96 poços. Cada poço foi equilibrado em soluções compostas por 50 mM de glicina e uma quantidade variável de
20 tampão Tris (dependendo da quantidade necessária para neutralização do pH especificado na Tabela 9) e cloreto de sódio (especificado na Tabela 10). O pH variou de 7,6 a 9,0, e o cloreto de sódio variou de 0 mM a 80 mM.

As soluções de tampão usadas em cada fileira foram diluídas em um sistema de pipetagem automatizado (Tecan 100 RST). A solução de estoque para os tampões foi preparada com 500 mM de glicina acidificada com HCl a pH 3,0 e subsequentemente neutralizada com 2 M de Base Tris nos níveis de pH indicados na Tabela 9. Essa titulação resultou em um nível de Tris que dependia do pH do tampão. O pH do tampão foi medido a uma diluição de 1 para 10 da concentração do tampão de estoque, o que correspondia à diluição preparada pelo sistema de pipetagem automatizado. Como resultado da acidificação da glicina a pH 3,0, o tampão contribui com cerca de 10 mM da força iônica da solução final. Foram feitos desafios de carga (fluido de carga) à resina: 5 mg/mL para medir o coeficiente de partição, K_p , e 122 mg/mL para medir a capacidade da resina de remover impurezas e produto ligado, Q , em equilíbrio com uma solução de proteína a uma concentração aproximadamente igual à concentração de carga da coluna.

Tabela 9: Tipo de tampão e pH alvo em cada poço

	Todas as colunas
A	50mM de Glicina, 8,8mM de Tris, pH 7,6
B	50mM de Glicina, 13,6mM de Tris, pH 7,8
C	50mM de Glicina, 16,0mM de Tris, pH 8,0

D	50mM de Glicina, 19,6mM de Tris, pH 8,2
E	50mM de Glicina, 28,4mM de Tris, pH 8,4
F	50mM de Glicina, 37,2mM de Tris, pH 8,6
G	50mM de Glicina, 64,0mM de Tris, pH 8,8
H	50mM de Glicina, 100mM de Tris, pH 9,0

Tabela 10: Níveis de NaCl (em mM) e desafios com proteína (mg/mL) em cada poço

Todas as fileiras	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

5 No primeiro estágio da triagem de alta produção, cada poço foi equilibrado nas condições de NaCl e pH conforme descritas nas Tabelas 9 e 10, em uma razão de volume de fase de 6:1 (300 μ L de solução: 50 μ L de resina). A placa foi agitada durante 20 minutos, permitidno que o equilíbrio fosse atingido. A solução
10 foi, então, removida por centrifugação da placa de filtro. Esse ciclo de equilibração foi repetido três vezes.

No segundo estágio, a resina em cada poço foi
15 desafiada com uma solução de MAb-AAB concentrada a 5 mg/mL de resina, com uma razão de volume de 6:1 (300 μ L de solução: 50 μ L de resina) à concentração de NaCl e

pH apropriados. Uma solução a 36 mg/mL de Mab-AAB em 1 mM de HEPES, 10 mM de NaCl, pH 7,0, adicionada de 300 ppm de Proteína A, foi usada como solução de estoque. A placa carregada foi agitada durante 20 minutos, permitindo que a resina e a solução equilibrassem. O sobrenadante foi removido da placa de filtro por centrifugação e coletado em uma placa de coleta. A concentração de proteína no sobrenadante de cada poço foi determinada por absorbância a 280nm.

No terceiro estágio, a resina foi lavada por adição de soluções nas condições de NaCl e pH especificadas, relacionadas na Tabela 10. O sobrenadante foi removido depois de agitar durante 20 minutos. No quarto estágio, adicionou-se 2 M de NaCl para remover a proteína restante que não se ligou à resina. Os coeficientes de partição foram calculados para cada poço usando-se a massa eluída dos estágios 3 e 4 e a concentração de produto do estágio 2 e são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Coeficientes de partição (Kp) para a triagem HTS de 96 poços 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

Conforme mostrado na Tabela 11, o valor de K_p pode ser usado para descrever as regiões em que MAb-AAB se liga ao meio TMAE com diferentes forças. A força da ligação de MAb-AAB ao meio TMAE pode ser manipulada variando-se as condições de pH e concentração de cloreto em zonas de atravessamento de fluxo ($K \leq 0,1$), partição fraca ($0,1 < K < 20$) e ligação ($K \geq 20$).

O sobrenadante do estágio de carga de todos os poços de cada zona foi amostrado e submetido a análise de Proteína A. Os resultados de ensaio dessas amostras são resumidos na Tabela 12. Há uma região de pH e condutividade em que a etapa de cromatografia em TMAE proporciona uma remoção muito significativa da Proteína A, com perda limitada de proteína para a resina. Descobriu-se que essa região está intimamente correlacionada com o valor do coeficiente de partição, K_p , e não com qualquer pH ou concentração de cloreto especificada.

Tabela 12: Valores logarítmicos de remoção de Proteína A (LRV) para dados de ligação de MAb-AAB da triagem 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

5 Exemplo 7.2. Operações de coluna sob condições de atravessamento de fluxo

O experimento a seguir foi realizado no modo de atravessamento de fluxo (FT), em que o MAb-AAB interage apenas muito fracamente com a coluna. Foram realizadas duas operações com desafios de carga de 110 mg/mL e 200 mg/mL de resina.

Para todas as operações de cromatografia de troca de ânions TMAE (HiCapM) descritas, foram usadas as seguintes condições (as exceções são indicadas nas descrições experimentais individuais).

Taxa de fluxo operacional- 150-300 cm/h

Equilibração 1 - 50 mM de Tris, 2,0 M de NaCl, pH 7,5 (5 volumes de coluna)

Equilibração 2 - conforme especificada, aproximadamente equivalente ao pH e teor de cloreto da
5 carga

Lavagem pós-carga - conforme especificada, aproximadamente equivalente ao pH e teor de cloreto da carga

Tampão de destilação - 50 mM de Tris, 2,0 M de NaCl, pH 7,5 (5 volumes de coluna)
10

Cromatografia de Proteína A Mabselect

A cultura contendo o anticorpo monoclonal foi purificada em escala piloto usando-se uma coluna MabSelect (2.389 mL) conectada a um sistema de
15 cromatografia Millipore K-prime 400. Uma coluna de Proteína A Mabselect foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de Tris / 150 mM de NaCl, pH 7,5, a uma taxa de fluxo de 300 cm/h. A coluna foi, então, carregada a uma carga de aproximadamente 40 mg de
20 produto / mL de resina. Isso foi seguido por uma lavagem com 5 volumes de coluna (CV) em 1 M de NaCl, 50 mM de Tris, pH 7,5, e uma lavagem com 5CV contendo 10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, pH 7,5. A coluna foi, então, eluída usando-se 50 mM de glicina, 75 mM de NaCl, pH

3,0. O produto reunido foi neutralizado a pH 7,6 usando-se 2 M de Tris, pH 8,5. O pico neutralizado tinha uma concentração de cloreto de aproximadamente 90 mM.

5 Cromatografia TMAE HiCap (M)

A Proteína A neutralizada reunido foi adicionalmente purificada em uma etapa TMAE com as soluções de equilíbrio, carga e lavagem a pH 7,5, com 50 mM de Tris e 75 de mM de cloreto de sódio. Foram
10 usados cinco volumes de coluna de lavagem. As dimensões da coluna e os desafios de carga para esses dois estudos foram: Operação 1: 7,0 cm de diâmetro x 20,6 cm de altura de leito (volume - 793 mL), com uma concentração de carga de 11,9 mg/mL; e Operação 2: 7,0
15 cm de diâmetro x 13 cm de altura de leito (volume - 500 mL), com uma concentração de carga de 17,6 mg/mL.

Essas condições de carga estavam na região de atravessamento de fluxo (FT) (Tabela 13). Usaram-se estudos de ligação por bateladas para medir o
20 coeficiente de partição (K_p), e o produto ligado foi determinado por proteína na destilação da coluna usando-se absorbância de UV. Esse método de determinação do produto ligado tipicamente subestima a quantidade de produto ligado durante a carga, devido à

eluição isocrática do produto durante a lavagem. Os níveis de Proteína A, HCP e agregados de alto peso molecular (HMW) na carga e produto reunido foram medidos, e a extensão da remoção foi calculada. Os resultados são apresentados na Tabela 13. Há uma remoção ruim de Proteína A e HMW e redução modesta nos níveis de HCP.

Tabela 13: Remoção de HCP, Proteína A e HMW sob condições de FT

Operação	Desafio de Carga (mg/mL)	Coeficiente de partição (Kp)	Produto ligado (mg/mL de resina)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (vezes)	Recuperação (%)
1	110	0,17	1,4	2,3	0,1	-	96
2	200	0,17	3,3	2,0	<0,1	1,5	96

* Os níveis de impureza foram de 38,5 ppm de ProA e 51.943 ppm de HCP (Operação 1), 8,8 ppm de ProA e 25.398 ppm de HCP (Operação 2).

Exemplo 7.3. Operações de coluna sob condições de partição fraca (alto desafio de produto)

Cromatografia de Troca de Ânions TMAE (HiCap M)

Várias operações de Proteína A Mabselect foram realizadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 7.2 para gerar o material de carga para essas

operações. O anticorpo parcialmente purificado reunido da etapa de Proteína A foi adicionalmente purificado na coluna TMAE. A carga para a coluna TMAE foi de 50 mM de Tris, pH 8,2. O diâmetro da coluna era de 0,5 cm, e a
5 altura do leito era de 10 cm de altura de leito (volume - 2,0 mL). A coluna foi desafiada a uma carga de 500 mg/mL de resina, com uma concentração de carga de 27,7 mg/mL.

A coluna foi equilibrada com 5CV de uma
10 solução contendo 50 mM de Tris, 2M de NaCl, pH 7,5, seguida por outra etapa de equilibrção compreendendo uma solução de 50 mM de Tris, pH 8,2. A coluna foi, então, carregada a 500 mg de produto/mL de resina com o pico de Proteína A neutralizada da etapa precedente, e
15 o produto foi recuperado no efluente de coluna durante o ciclo de carga e alguns volumes de coluna da fração de lavagem.

Essas condições de carga estão na região de partição fraca. Foram usados estudos de ligação por
20 bateladas para medir o coeficiente de partição (K_p) e a ligação de produto a altas concentrações de proteína. A pH 8,2, e um teor aproximado de cloreto de 12 mM, o coeficiente de partição, K_p , é estimado em 1,9 (por interpolação do conjunto de dados da triagem HTS).

Os níveis de HCP e Proteína A foram medidos em três frações durante um estágio de carga, representando desafios de carga de aproximadamente 250, 375 e 500 mg/mL de resina. Os resultados do exemplo 7.3 são apresentados na Tabela 14. Esses resultados demonstram que desafios de produto muito altos podem ser conseguidos no modo de partição fraca, sem a passagem de impurezas. Conseguiu-se uma excelente redução tanto de HCP, quanto de Proteína A, juntamente com uma redução de 50% do teor de HMW. Em comparação com os resultados para a operação no modo de atravessamento de fluxo da Tabela 13, a remoção de impurezas foi muito melhor no modo de partição fraca.

Tabela 14: Remoção de HCP, Proteína A e HMW para um desafio de carga de 500 mg/mL de TMAE

	Fração precoce (250 mg/mL)	Fração média (375 mg/mL)	Fração tardia (500 mg/mL)	Produto final reunido (ppm)
ppm de HCP residual (ng/mg de produto)	< 7,6	< 7,6	< 7,6	< 7,6
Valor log de remoção de HCP (LRV)	> 3,5	> 3,5	> 3,5	> 3,5
ppm de Proteína A residual (ng/mg de produto)	0,3	Não determinado	0,1	0,6

Valor log de remoção de ProA (LRV)	2,9	Não determinado	2,3	2,5
HMW	Não determinado	Não determinado	Não determinado	remoção de 2 vezes

* As impurezas na carga foram de 25.398 ppm

de HCP, 99,5 ppm de Proteína A e 2,3% de HMW

Exemplo 7.4. Operações de coluna sob condições de partição fraca (estudos de robustez)

5 Para confirmar ainda mais o desempenho da
coluna TMAE na região de partição fraca, foram
projetadas várias operações variando o pH e a
concentração de NaCl na carga para testar a robustez do
processo. Todas as operações foram realizadas a um
10 desafio de carga de 250 mg/mL de resina. Foram
realizadas várias operações de Proteína A Mabselect
essencialmente conforme descrito no Exemplo 7.2 para
gerar o material de carga para essas operações. O único
fator que variou nessas operações foi a concentração de
15 cloreto de sódio na eluição de Proteína A, que foi
variada para corresponder à concentração de NaCl na
carga de TMAE para um experimento particular. As
colunas foram equilibradas com tampões Equil 2 e
lavadas com tampões de lavagem que tinham

aproximadamente os mesmos pH e teor de cloreto de sódio que a carga.

Essas condições de carga estão na região de partição fraca. Estudos de ligação por bateladas foram usados para medir o coeficiente de partição (Kp). As operações são classificadas pelos coeficientes de partição relacionados na Tabela 15. O produto ligado foi determinado por medição da proteína na destilação de coluna usando-se absorbância de UV, e varia de 7,8-25,3 mg/mL. Os resultados de Proteína A, HCP e HMW desses experimentos também são apresentados na Tabela 15. A remoção de todas as impurezas se mostrou robusta nas faixas operacionais que cobrem 13,5-38,8 mM de cloreto total e pH 7,8-8,4.

Tabela 15: Estudos de robustez do processo na remoção de HCP, Proteína A e HMW no modo WP

Concentração de NaCl (mM)	Kp	Produto Ligado (mg/mL)	pH	HCP na Carga (ppm)	Proteína A na Carga (ppm)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (Fold)	Recuperação (%)
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

* Os níveis de impureza foram de 38,5 ppm de ProA e 51.943 ppm de HCP (Operação 1), 8,8 ppm de ProA e 25.398 ppm de HCP (Operação 2).

+ inclui a contribuição de íon Cl^- de NaCl, 5 tampões e agentes de titulação

Exemplo 7.5. Sumário

Desses estudos, pode-se observar que a remoção de Proteína A (LRV) varia fortemente com o K_p , ao passo que o LRV de HCP é excelente em todos os valores de K_p a ou acima de 0,26, mas muito reduzida a $K_p = 0,17$ (sob condições de atravessamento de fluxo). A remoção de proteína de célula hospedeira é mais de um log menor para condições de atravessamento de fluxo, em comparação com condições de partição fraca, mesmo para um desafio de carga reduzido. O produto ligado varia de 7,8-25 mg/mL para essas condições de partição fraca nessa combinação de resina e anticorpo monoclonal. O coeficiente de partição parece ser ótimo entre $0,41 < K_p < 5,4$. Não parece ser ótimo a $K_p = 0,17$ e um produto ligado de 1,4-3.3mg/mL, as condições do Exemplo 7.2.

Esses estudos sugerem um modo alternativo de purificação de um polipeptídio produzido usando-se cultura celular em meios de projeto racional, o que reduz significativamente a presença de impurezas, 5 agregados de elevado peso molecular, DNA, proteínas de célula hospedeira e outros.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de um polipeptídio em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

5 (1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse; e

b. um meio de cultura celular desejado
10 compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de
15 interesse; e

(2) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse.

2. Método de produção de um polipeptídio em
20 uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse; e

b. um meio de cultura celular desejado, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse, ambas as concentrações sendo multiplicadas por um fator de linha basal; e

(2) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse.

3. Método de produção de um polipeptídio em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse; e

b. um meio de cultura celular desejado, compreendendo uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para

incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para uma densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal; e

(2) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse.

10 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende um método de recuperação de um polipeptídio purificado de um fluido de carga, compreendendo as etapas de:

15 passagem do fluido de carga através de um meio em uma coluna em condições operacionais que façam com que o meio se ligue a pelo menos 2,8 mg de polipeptídio por mL de meio, em que o meio é selecionado do grupo que consiste em um meio de troca de íons com carga, uma resina de cromatografia de
20 interação hidrofóbica e uma resina de cromatografia de afinidade de metal imobilizado; e

 recuperação do polipeptídio purificado do efluente da coluna.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende um método de recuperação de um polipeptídeo purificado de um fluido de carga, compreendendo as etapas de:

passagem do fluido de carga através de um meio em uma coluna em condições operacionais definidas por um coeficiente de partição de pelo menos 0,1; e recuperação do polipeptídeo purificado do efluente da coluna.

6. Método de produção de um polipeptídeo em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídeo de interesse; e
b. um meio de cultura celular de partida, em que o volume do meio de cultura celular de partida é de cerca de 60-99% do volume de um volume de meio de cultura celular desejado;

(2) o fornecimento de um meio de cultura celular de alimentação à cultura celular de acordo com a etapa (1), em que o volume do meio de cultura celular

de alimentação é de cerca de 1-40% do volume de meio de cultura celular desejado, e em que o meio de cultura celular desejado resultante compreende uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular, e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse; e

(3) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse.

7. Método de produção de um polipeptídio em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular, compreendendo:

a. células compreendendo um ácido nucléico que codifique um polipeptídio de interesse; e

b. um meio de cultura celular de partida, em que o volume do meio de cultura celular de partida é de cerca de 60-99% do volume de um volume de meio de cultura celular desejado;

(2) o fornecimento de um meio de cultura celular de alimentação à cultura celular de acordo com

a etapa (1), em que o volume do meio de cultura celular de alimentação é de cerca de 1-40% do volume de meio de cultura celular desejado, e em que o meio de cultura celular desejado resultante compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para uma densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal; e

(3) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam a expressão do polipeptídio de interesse.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular de partida compreende uma concentração, B, do aminoácido de acordo com a fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, em que Z é uma concentração do aminoácido no meio de cultura celular de alimentação, e V é um volume do meio

de cultura de alimentação como uma proporção do volume de meio de cultura celular desejado.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 7 e 8, **caracterizado** pelo fato de que Y é de 0 a cerca de 1,5.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 7 e 8, **caracterizado** pelo fato de que F é de cerca de 1 a cerca de 1,5.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 7 e 8, **caracterizado** pelo fato de que Y é de 0 a cerca de 1,5, e F é de cerca de 1 a cerca de 1,5.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende mais do que ou o mesmo que cerca de 3 mM de tirosina.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de leucina.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de lisina.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de treonina.

5 16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de prolina.

10 17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular desejado compreende entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de valina.

15 18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração combinada de leucina, lisina, treonina, prolina e valina no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 35 mM e cerca de 150 mM.

20 19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração combinada de leucina, lisina, treonina e valina no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 60% e cerca de 80% da concentração dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura celular desejado.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração combinada dos aminoácidos essenciais no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 30% e cerca de 50% da concentração dos aminoácidos totais no meio de cultura celular desejado.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de aminoácidos no meio de cultura celular desejado está entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de prolina na cultura celular é mantida em mais de cerca de 1 mM.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de prolina na cultura celular é mantida em mais de cerca de 2 mM.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, **caracterizado** pelo fato de que a cultura celular é uma cultura celular em grande escala.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, **caracterizado** pelo fato de que as células são células animais.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 e 6-25, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídio é purificado.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, **caracterizado** pelo fato de que o meio é um meio definido.

28. Polipeptídio, **caracterizado** pelo fato de que é produzido de acordo com método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-27.

29. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende o polipeptídio de acordo com a reivindicação 28 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

30. Método de cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células; e

b. um meio de cultura celular desejado compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular; e

(2) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam o crescimento e replicação das células na cultura celular.

31. Método de cultura celular, **caracterizado**
5 pelo fato de que compreende:

(1) a formação de uma cultura celular compreendendo:

a. células; e

b. um meio de cultura celular desejado,
10 compreendendo uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, caracterizado pelo fato de que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, M é um multiplicador para uma
15 densidade celular de pico desejada da cultura celular, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal; e

(2) a manutenção da cultura celular sob condições que permitam o crescimento e replicação das
20 células na cultura celular.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, **caracterizado** pelo fato de que a cultura celular é uma cultura celular em grande escala.

33. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, **caracterizado** pelo fato de que as células são células animais.

34. Meio de cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM.

35. Meio de cultura celular para uso na produção de um polipeptídio de interesse, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM.

36. Meio de cultura celular para uso na produção de um polipeptídio de interesse, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular, e uma concentração do aminoácido que é calculada para incorporação no polipeptídio de interesse.

37. Meio de cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma concentração do aminoácido que é usado por unidade de massa celular, M é um multiplicador para a densidade

celular de pico desejada da cultura celular, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal.

38. Meio de cultura celular para uso na
5 produção de um polipeptídio de interesse, **caracterizado**
pelo fato de que compreende uma concentração de aminoácidos ajustada à linha basal, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é uma
concentração do aminoácido que é usado por unidade de
10 massa celular, P é uma concentração do aminoácido que é usado para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é um multiplicador para a densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é um multiplicador para a
15 concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular, e F é um fator de linha basal.

39. Meio de cultura celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-38, **caracterizado**
20 pelo fato de que o meio de cultura celular é um meio de cultura celular em grande escala.

40. Meio de cultura celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-38, **caracterizado**

pelo fato de que o meio de cultura celular é um meio de cultura de células animais.

41. Meio de cultura celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-40, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura celular é um meio definido.

42. Método para a determinação de uma concentração otimizada de um aminoácido usado em um meio de cultura celular para a produção de um polipeptídio de interesse em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a determinação da concentração de aminoácido requerida para a massa celular das células a uma densidade celular alvo;

(2) a determinação da concentração de aminoácido requerida para produzir o polipeptídio de interesse a um título de polipeptídio alvo;

(3) a determinação da concentração de aminoácido requerida para manutenção celular das células; e

(4) a adição das concentrações obtidas na etapa (1), etapa (2) e etapa (3) para fornecer uma concentração otimizada do aminoácido usado no meio de

cultura celular para a produção do polipeptídio de interesse.

43. Método para a determinação de uma concentração de aminoácido otimizada, A, de um aminoácido usado em um meio de cultura celular para a produção de um polipeptídio de interesse em uma cultura celular, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(1) a determinação da concentração de aminoácido, X, requerida para a massa celular das células a uma densidade celular estabelecida;

(2) a determinação da concentração de aminoácido, P, requerida para produzir o polipeptídio de interesse a um título de polipeptídio estabelecido; e

(3) a determinação da concentração de aminoácido otimizada, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (M \cdot Y \cdot X)] \cdot F$, em que M é um multiplicador para uma densidade celular alvo desejada da cultura celular, N é um multiplicador para uma concentração alvo desejada do polipeptídio de interesse, Y é um fator de manutenção celular; e F é um fator de linha basal.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42
ou 43, **caracterizado** pelo fato de que a cultura celular
é uma cultura celular em grande escala.

45. Método, de acordo com a reivindicação 42
5 ou 43, **caracterizado** pelo fato de que a cultura celular
é uma cultura de células animais.

Figura 1

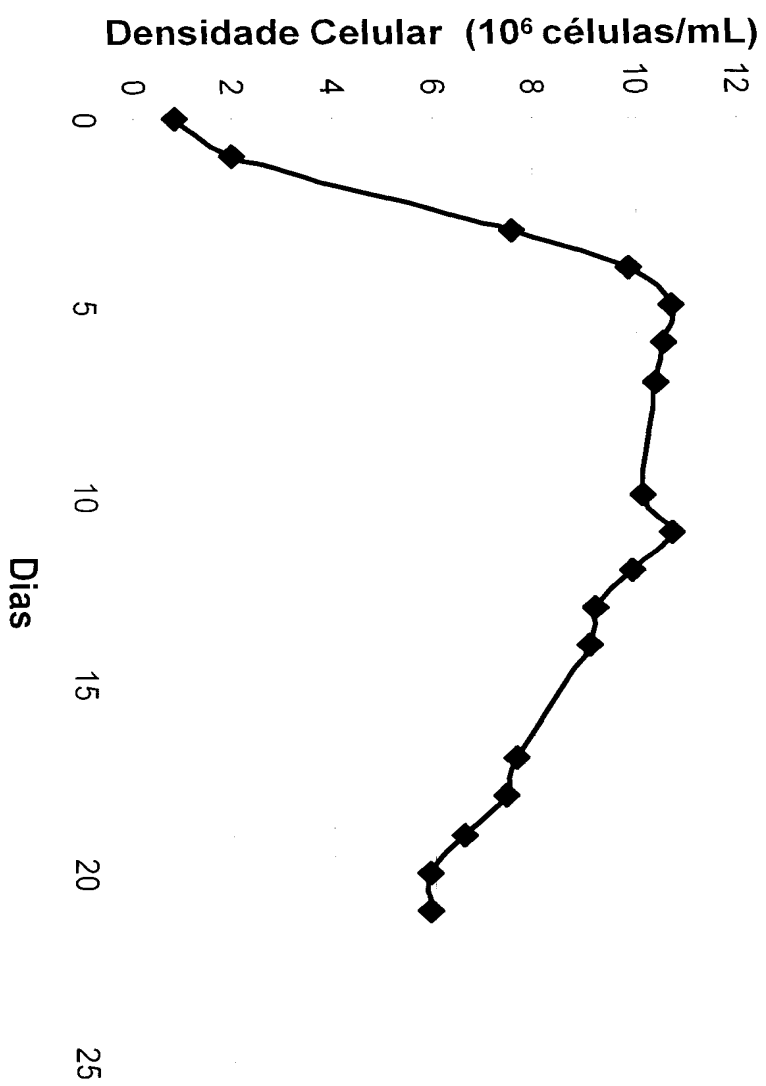


Figura 2

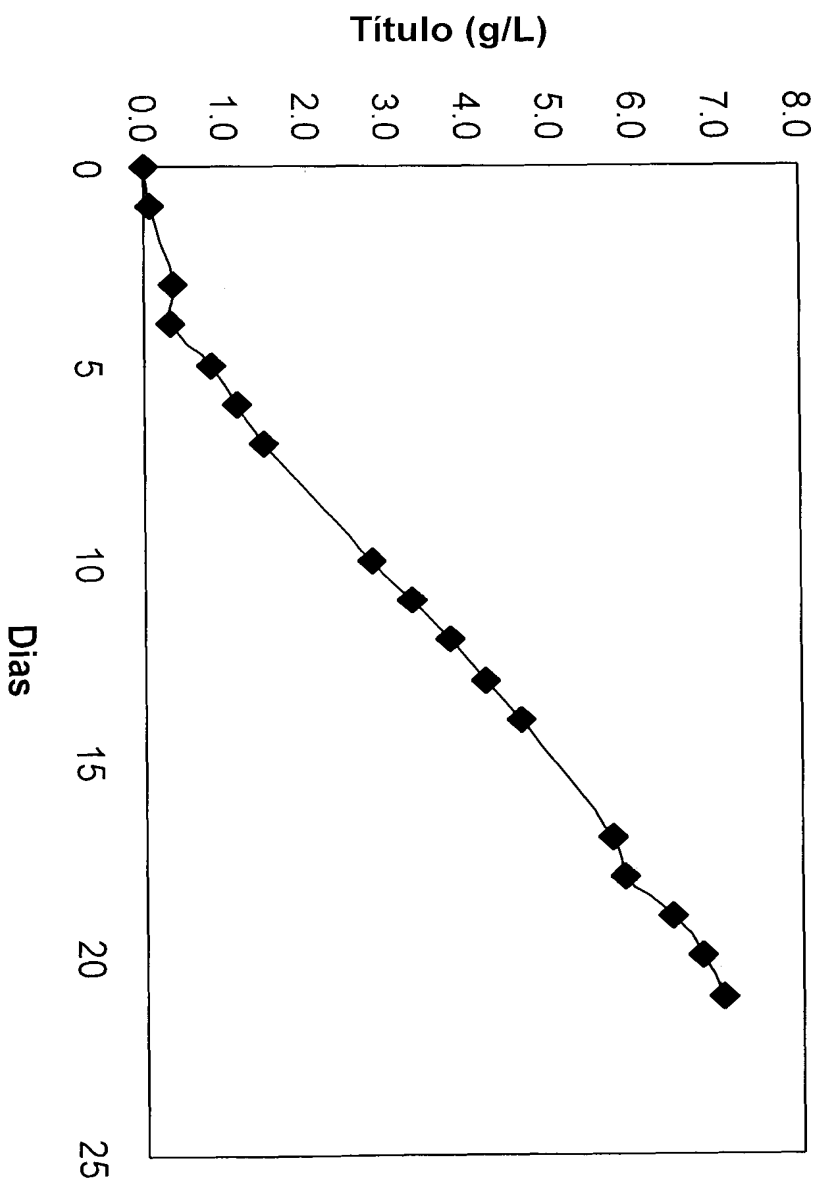


Figura 3

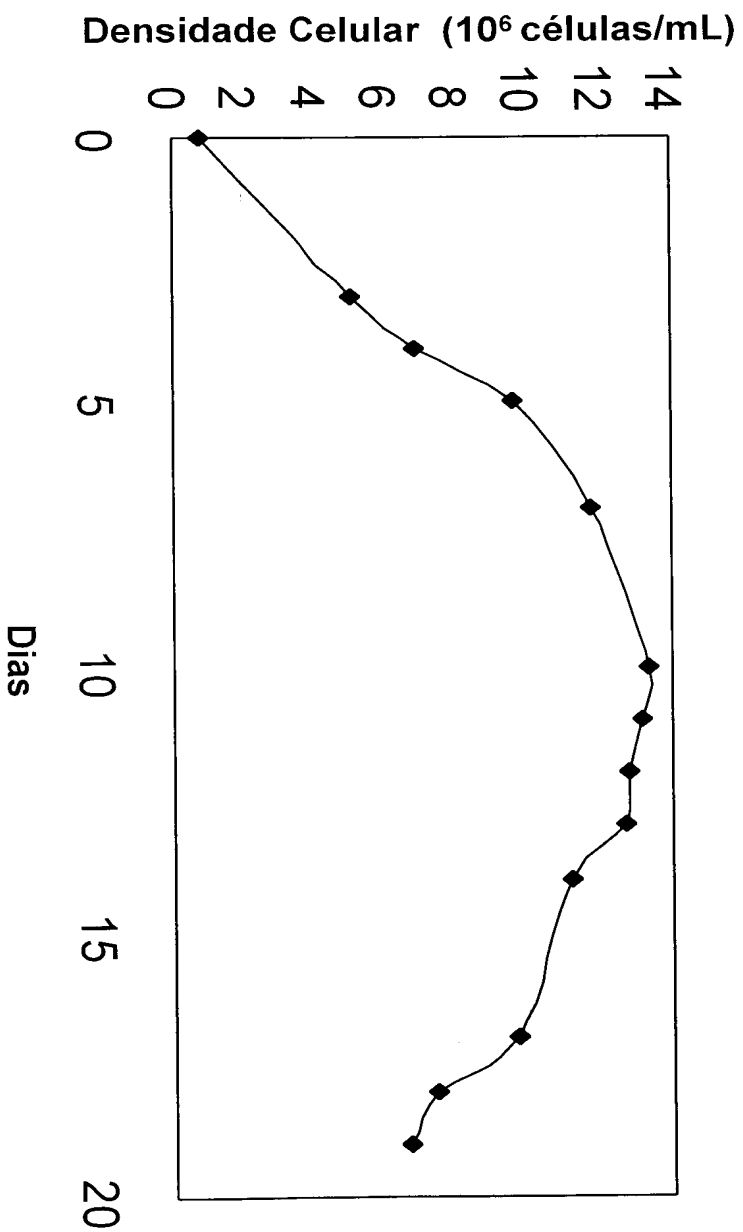


Figura 4

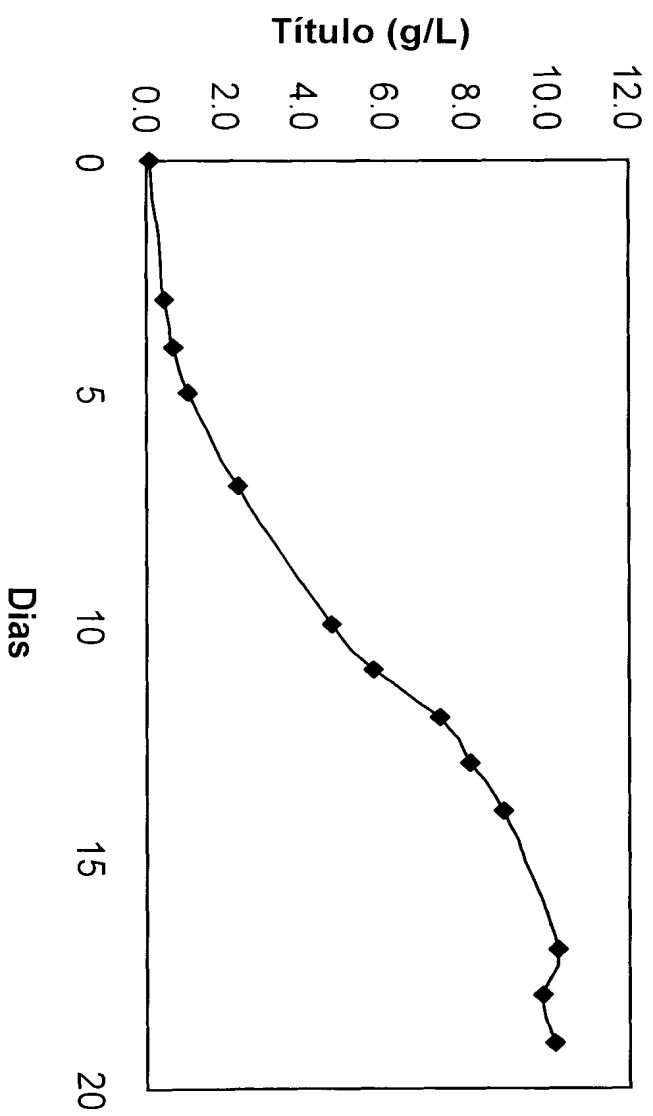


Figura 5

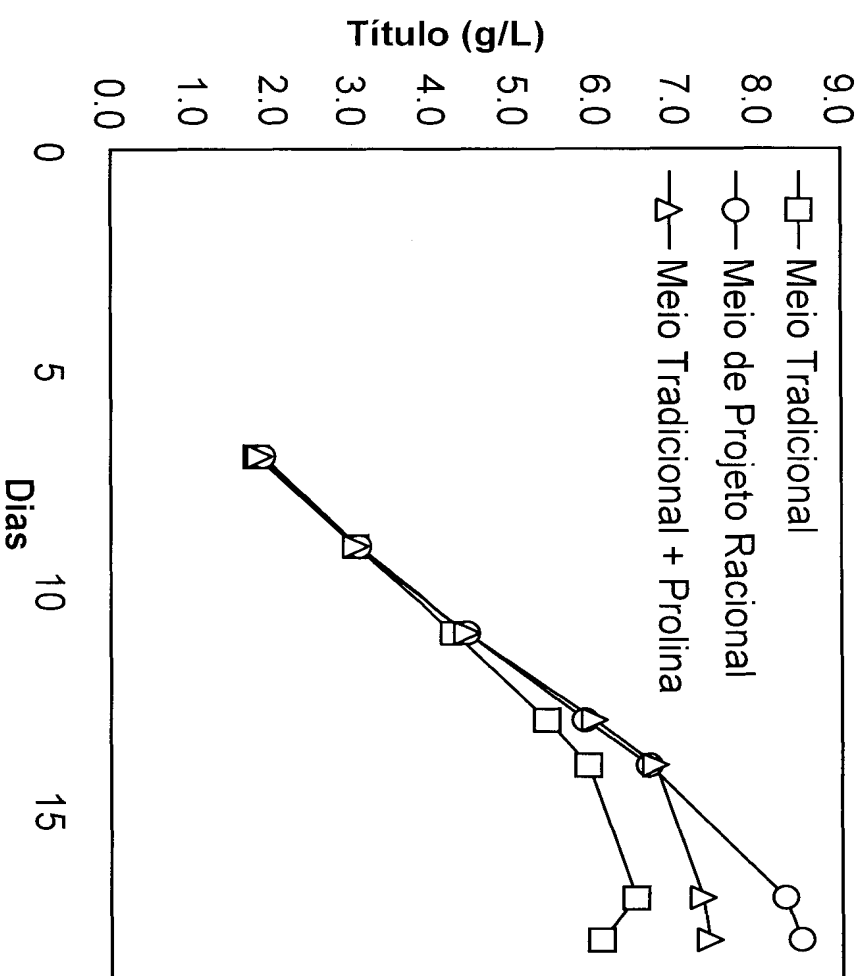


Figura 6

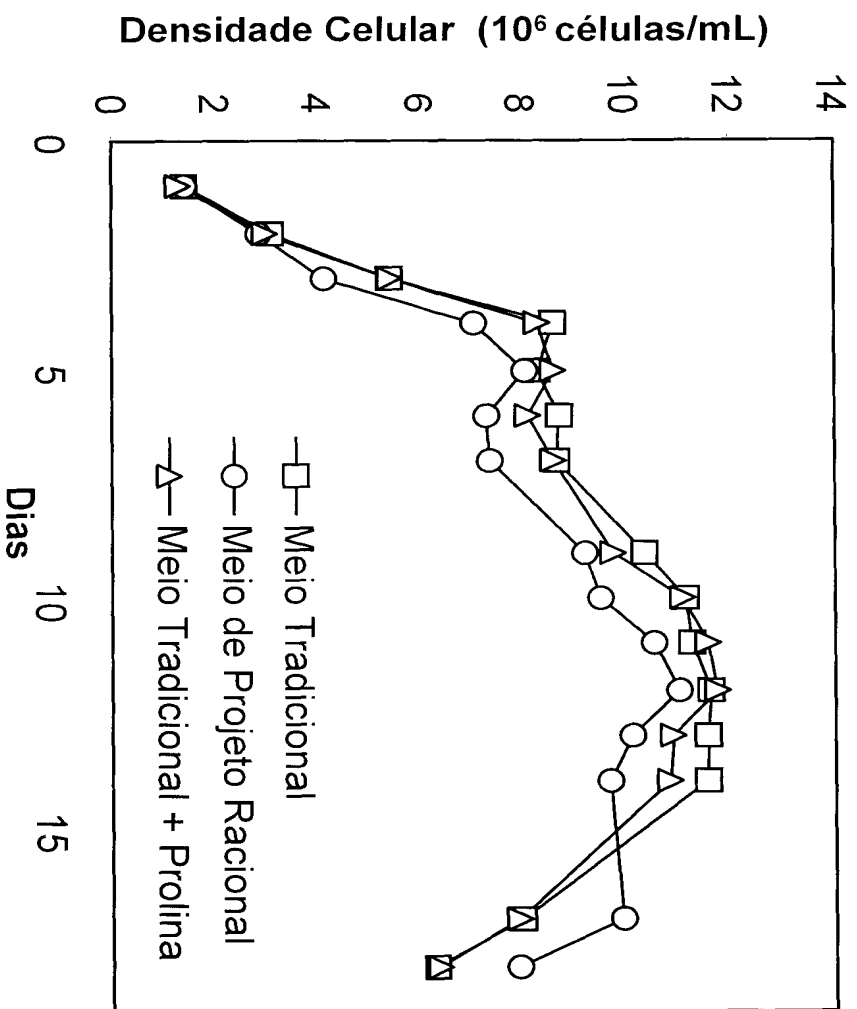


Figura 7

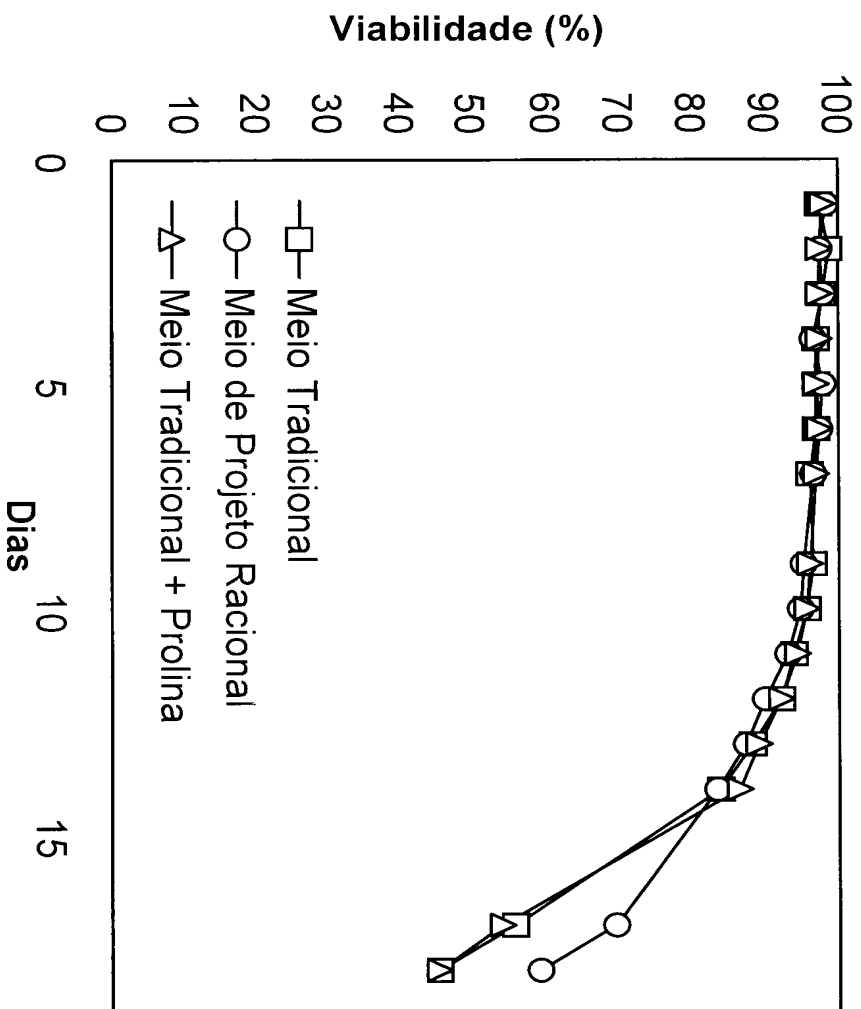


Figura 8A

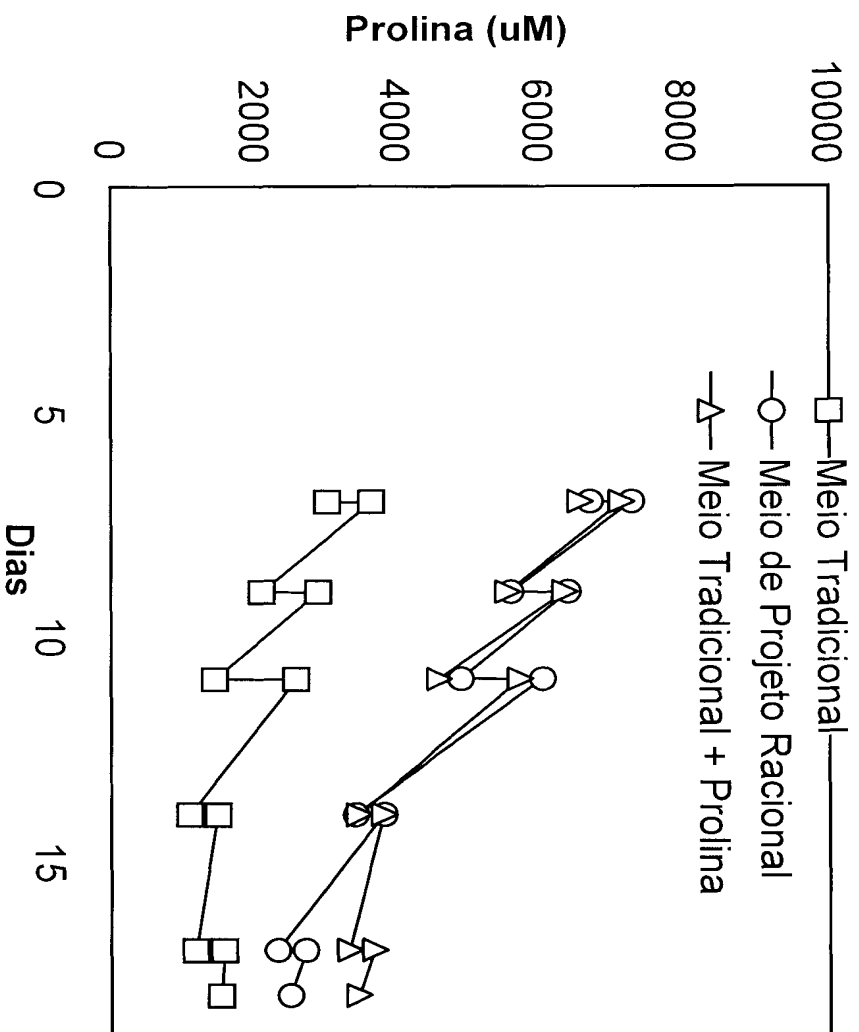


Figura 8B

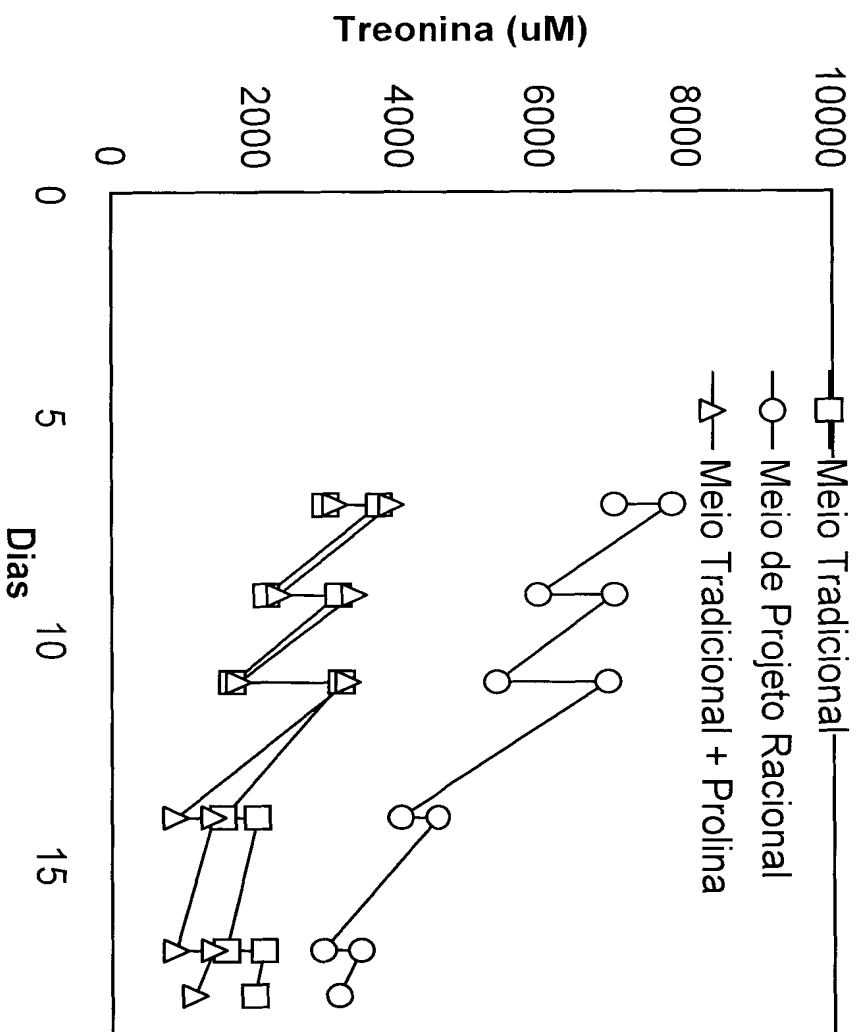


Figura 8C

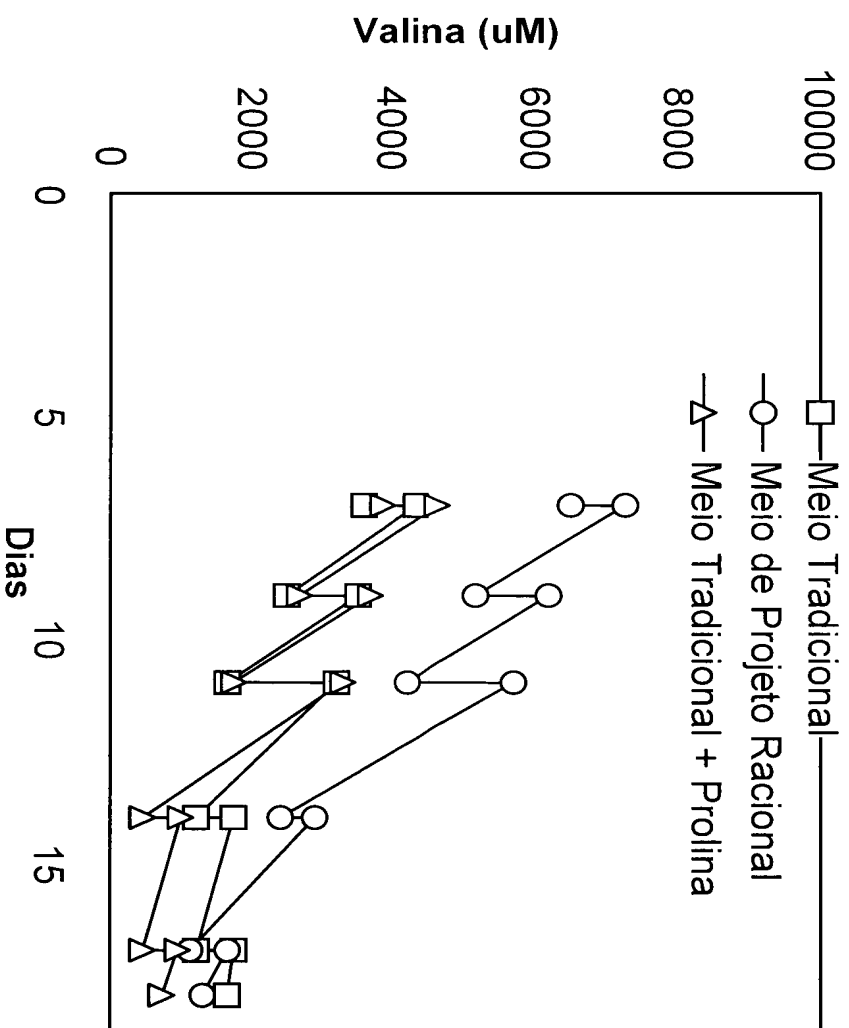


Figura 8D

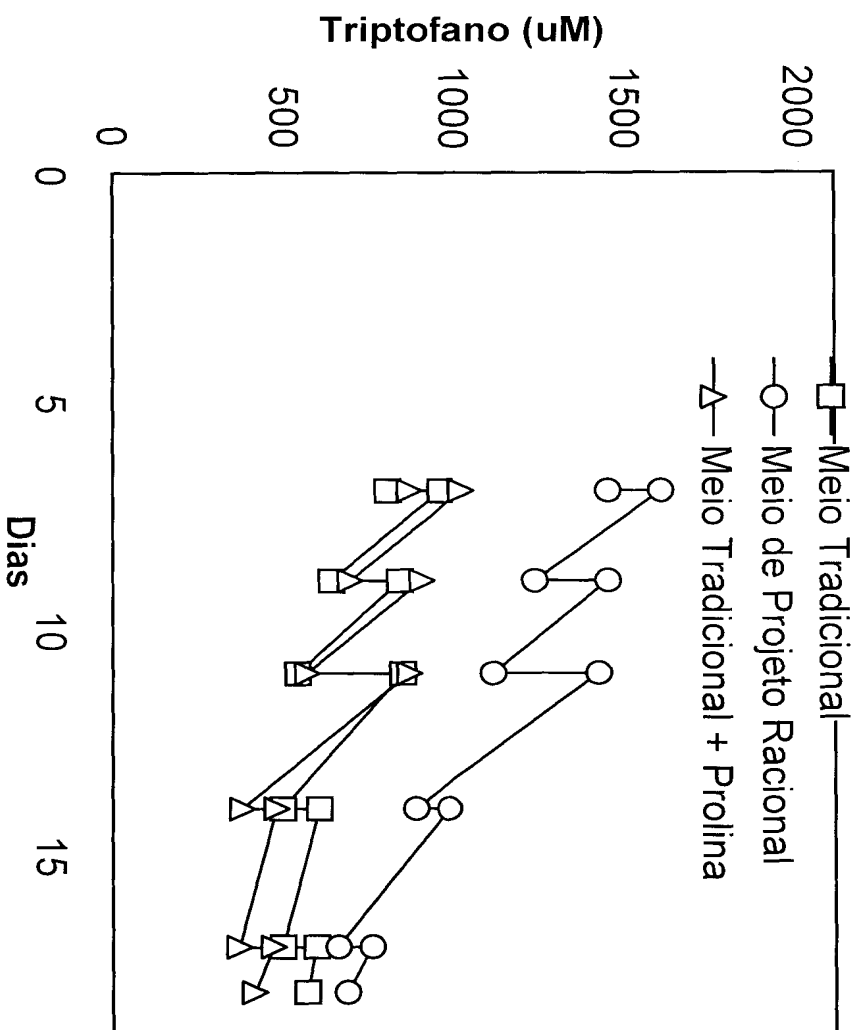


Figura 8E

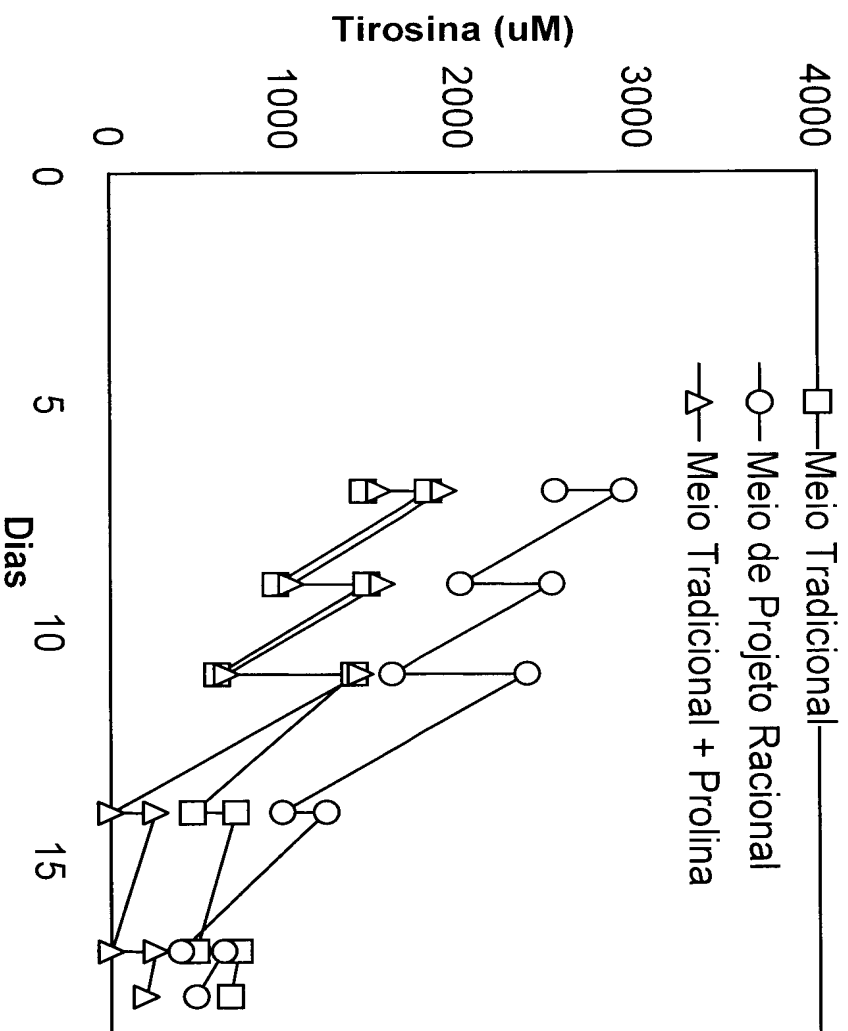


Figura 9

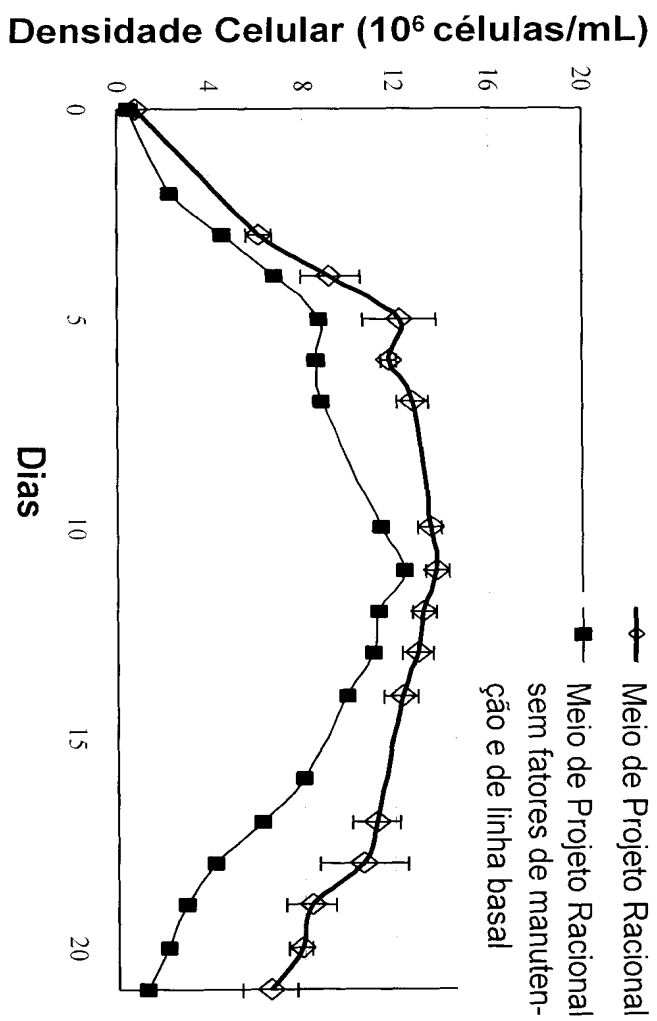


Figura 10

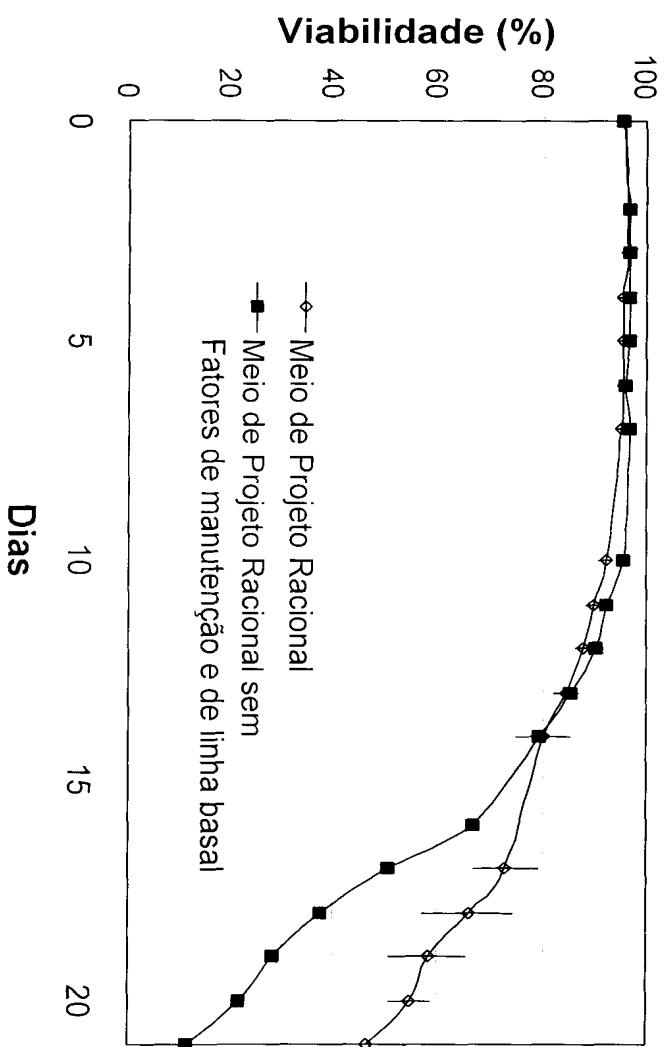
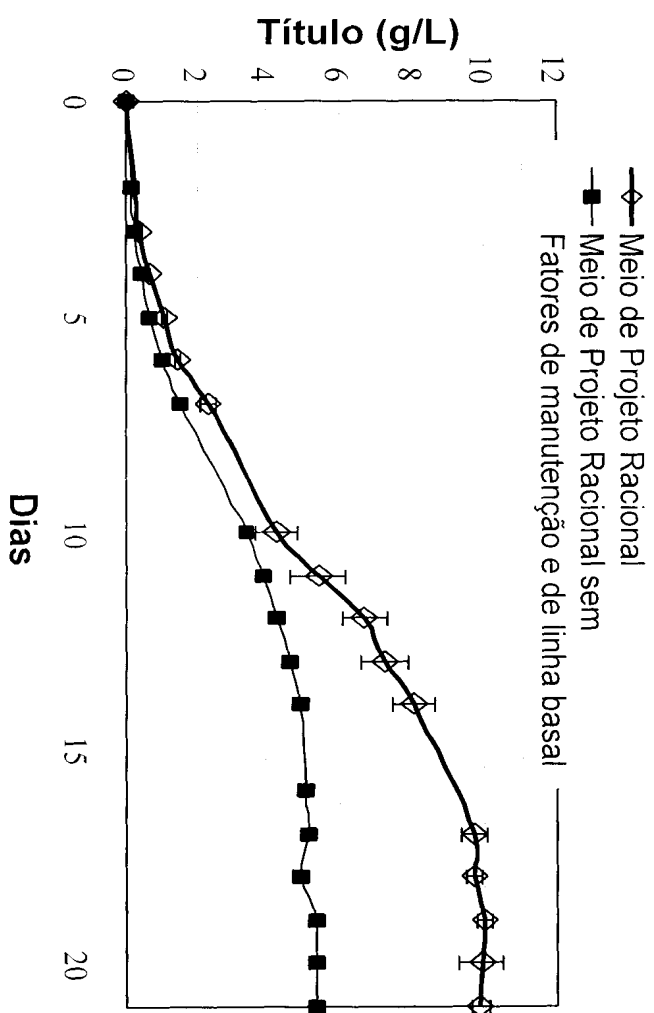


Figura 11



RESUMO

"MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO EM UMA CULTURA CELULAR; POLIPEPTÍDIO PRODUZIDO DE ACORDO COM MÉTODO; COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O POLIPEPTÍDIO; MEIO DE CULTURA CELULAR; MEIO DE CULTURA CELULAR PARA USO NA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO DE INTERESSE; MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE UMA CONCENTRAÇÃO OTIMIZADA DE UM AMINOÁCIDO USADO EM UM MEIO DE CULTURA CELULAR PARA A PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDIO DE INTERESSE EM UMA CULTURA CELULAR"

Esta invenção se refere a métodos para projetar racionalmente meios de cultura celular para uso em culturas celulares, por exemplo, culturas celulares empregadas na produção de polipeptídios; meios de cultura celular projetados com os métodos apresentados; métodos de produção de um polipeptídio de interesse, por exemplo, um anticorpo, usando esses meios; polipeptídios produzidos usando-se os métodos e meios aqui apresentados; e composições farmacêuticas contendo esses polipeptídios. Os meios racionalmente projetados contêm uma concentração de um aminoácido que é calculada para uso na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para uso na manutenção celular, e uma concentração do aminoácido que é

calculada para incorporação no polipeptídio de interesse. Os meios racionalmente projetados podem conter uma concentração ajustada à linha basal, A, de pelo menos um aminoácido que é calculada de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X é a concentração do aminoácido que é usada por unidade de massa celular, P é a concentração do aminoácido que é usada para incorporação no polipeptídio de interesse por unidade de título de polipeptídio, M é o multiplicador para a densidade celular de pico desejada da cultura celular, N é o multiplicador para a concentração desejada do polipeptídio de interesse, Y é o fator de manutenção celular; e F é um fator de linha basal. Esses meios racionalmente projetados também podem ser usados para produzir um meio de cultura celular de partida compreendendo uma concentração, B, de pelo menos um aminoácido de acordo com a fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, em que Z é uma concentração do aminoácido no meio de cultura celular de alimentação, e V é um volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume de meio de cultura celular desejado.