

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.11.07	(73) Titular(es): WYETH LLC 235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017-5755 US
(30) Prioridade(s): 2006.11.08 US 858289 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.07.15	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.03.18 137/2015	(72) Inventor(es): DENIS DRAPEAU US YEN-TUNG LUAN US WENG WANG US RYAN NOLAN US
	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE PARA CULTURA DE CÉLULAS**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS PARA CONCEBER RACIONALMENTE MEIOS DE CULTURA DE CÉLULAS PARA A UTILIZAÇÃO EM CULTURAS DE CÉLULAS, P. EX., CULTURAS DE CÉLULAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE POLIPÉPTIDOS; MEIOS DE CULTURA DE CÉLULAS CONCEBIDOS COM OS MÉTODOS DIVULGADOS; MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM POLIPÉPTIDO DE INTERESSE, P. EX., UM ANTICORPO, UTILIZANDO ESSES MEIOS; POLIPÉPTIDOS PRODUZIDOS UTILIZANDO OS MÉTODOS E MEIOS AQUI DIVULGADOS; E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ESSES POLIPÉPTIDOS. OS MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE CONTÊM UMA CONCENTRAÇÃO DE UM AMINOÁCIDO QUE É CALCULADA PARA A UTILIZAÇÃO NA MASSA CELULAR, UMA CONCENTRAÇÃO DO AMINOÁCIDO QUE É CALCULADA PARA A UTILIZAÇÃO NA MANUTENÇÃO DE CÉLULAS, E UMA CONCENTRAÇÃO DO AMINOÁCIDO QUE É CALCULADA PARA A INCORPORAÇÃO NO POLIPÉPTIDO DE INTERESSE. OS MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE PODEM CONTER UMA CONCENTRAÇÃO DE LINHA DE BASE AJUSTADA, A, DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO QUE É CALCULADA DE ACORDO COM A FÓRMULA $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, EM QUE X CORRESPONDE À CONCENTRAÇÃO DO AMINOÁCIDO QUE É UTILIZADA POR UNIDADE DE MASSA CELULAR, P CORRESPONDE À CONCENTRAÇÃO DO AMINOÁCIDO QUE É UTILIZADA PARA A INCORPORAÇÃO NO POLIPÉPTIDO DE INTERESSE POR UNIDADE DE TÍTULO DE POLIPÉPTIDO, M CORRESPONDE AO MULTIPLICADOR PARA A DENSIDADE CELULAR MÁXIMA DESEJADA DA CULTURA DE CÉLULAS, N CORRESPONDE AO MULTIPLICADOR PARA A CONCENTRAÇÃO DESEJADA DO POLIPÉPTIDO DE INTERESSE, Y CORRESPONDE AO FATOR DE MANUTENÇÃO DE CÉLULAS; E F CORRESPONDE AO FATOR DE LINHA DE BASE. ESTES MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE TAMBÉM PODEM SER UTILIZADOS PARA PRODUZIR UM MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS INICIAL COMPREENDENDO UMA CONCENTRAÇÃO, B, DE PELO MENOS UM AMINOÁCIDO DE ACORDO COM A FÓRMULA $B=[A-(Z*V)]/(1-V)$, EM QUE Z

CORRESPONDE A UMA CONCENTRAÇÃO DO AMINOÁCIDO NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DE ALIMENTAÇÃO, E V CORRESPONDE A UM VOLUME DO MEIO DE CULTURA DE ALIMENTAÇÃO COMO UMA PROPORÇÃO DO VOLUME DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DESEJADO.

RESUMO**"MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE PARA CULTURA DE CÉLULAS"**

Esta invenção refere-se a métodos para conceber racionalmente meios de cultura de células para a utilização em culturas de células, p. ex., culturas de células utilizadas na produção de polipéptidos; meios de cultura de células concebidos com os métodos divulgados; métodos de produção de um polipéptido de interesse, p. ex., um anticorpo, utilizando esses meios; polipéptidos produzidos utilizando os métodos e meios aqui divulgados; e composições farmacêuticas que contêm esses polipéptidos. Os meios concebidos racionalmente contêm uma concentração de um aminoácido que é calculada para a utilização na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células, e uma concentração do aminoácido que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse. Os meios concebidos racionalmente podem conter uma concentração de linha de base ajustada, 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 corresponde à concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, P corresponde à concentração do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido, M corresponde ao multiplicador para a densidade celular máxima desejada da cultura de células, N corresponde ao multiplicador para a concentração desejada do polipéptido de interesse, Y corresponde ao fator de manutenção de células; e F corresponde ao fator de linha de base. Estes meios concebidos racionalmente também podem ser utilizados para produzir um meio de cultura de células inicial compreendendo uma concentração, B, de pelo menos um

aminoácido de acordo com a fórmula $B=[A-(Z*V)]/(1-V)$, em que Z corresponde a uma concentração do aminoácido no meio de cultura de células de alimentação, e V corresponde a um volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume do meio de cultura de células desejado.

DESCRIÇÃO

"MEIOS CONCEBIDOS RACIONALMENTE PARA CULTURA DE CÉLULAS"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

Esta divulgação refere-se a métodos para conceber racionalmente meios de cultura de células para a utilização em culturas de células utilizadas, p. ex., na produção de polipéptidos; meios de cultura de células concebidos com os métodos divulgados; métodos de produção de grandes quantidades de um polipéptido de interesse, p. ex., um anticorpo, utilizando esses meios; polipéptidos produzidos utilizando os métodos e meios aqui divulgados; e composições farmacêuticas que contêm esses polipéptidos. A invenção é particularmente útil em culturas de células em grande escala. Os métodos e as composições aqui divulgados são particularmente úteis para produzir quantidades significativas de polipéptidos em culturas *batch* (sistema fechado), *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) e em perfusão de células animais.

Antecedentes da Técnica Relacionados

Uma grande proporção de produtos de biotecnologia, disponíveis comercialmente ou apenas em desenvolvimento, corresponde a terapêutica de proteínas; deste modo, existe uma procura pela produção destes polipéptidos nas culturas de células. Além disso, a maquinaria celular de uma célula animal (em oposição a, p. ex., uma célula bacteriana) é muitas vezes necessária para produzir muitas formas de terapêutica de polipéptidos (tais como proteínas glicosiladas ou anticorpos monoclonais (Mabs - Monoclonal antibodies) produzidos por hibridoma). Consequentemente, existe uma procura crescente pela otimização da produção destes polipéptidos nas culturas de células e, particularmente, nas culturas de células animais.

Em comparação com culturas de células bacterianas, as culturas de células animais têm taxas de produção mais baixas e geram habitualmente quantidades de produção inferiores. Deste modo, uma quantidade significativa de investigação concentra-se nas condições de cultura de células animais que otimizam a produção de polipéptidos, isto é, as condições que suportam uma densidade celular elevada e um título elevado. Por exemplo, foi determinado que a manutenção de concentrações de glicose nos meios de cultura de células em baixas concentrações e o cultivo de células numa fase de produção numa osmolalidade de cerca de 400 a 600 mOsm aumentam a produção de proteínas recombinantes de culturas de células animais, em que o cultivo em todas as fases encontra-se igualmente numa concentração de glutamina selecionada (preferencialmente entre cerca de 0,2 e cerca de 2 mM). Igualmente, foi determinado que a alimentação restrita de glicose a culturas de células animais em processos *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) controla a produção de lactato sem necessitar da alimentação de taxa constante de glicose. Além disso, é sabido que a modificação da concentração cumulativa total de aminoácidos, da concentração de aminoácidos individuais e das relações de aminoácidos individuais entre si (p. ex., glutamina para asparagina) e com os aminoácidos totais (p. ex., glutamina para aminoácidos totais) nos meios de uma cultura de células em grande escala pode resultar numa produção de polipéptidos em grande escala substancialmente melhorada.

Tradicionalmente, os estudos de meio para culturas de células animais concentram-se em três técnicas: 1) enriquecimento dos componentes de meio do meio inicial e aumento da frequência de alimentação de cultura; 2) aplicação de conceção multifatorial em diferentes forças de meio e diferentes concentrações de componentes; e 3) análise de meio condicionado (gasto) para aminoácidos,

vitaminas e outros componentes, e adição desses componentes que se encontram em baixos níveis ou são reduzidos. Estes métodos utilizam geralmente densidade celular, viabilidade e respostas de título como indicadores de otimização.

Contudo, os métodos acima detetam apenas indiretamente o requisito de nutrientes para células com base no resultado final, isto é, densidade celular, viabilidade e título, em vez de detetarem e fornecerem à célula o requisito real de nutrientes para uma produção de proteínas otimizada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação fornece métodos para conceber racionalmente os meios de cultura de células, p. ex., meios de cultura de células em grande escala, para a utilização, p. ex., em culturas de células em grande escala utilizadas na produção de polipéptidos; meios de cultura de células, p. ex., meios de cultura de células em grande escala, concebidos com os métodos divulgados; métodos de produção de grandes quantidades de um polipéptido de interesse, p. ex., um anticorpo, utilizando esses meios; polipéptidos produzidos utilizando os métodos e meios aqui divulgados; e composições farmacêuticas que contêm esses polipéptidos. Estes métodos e estas composições são úteis para a cultura, p. ex., cultura *batch* (sistema fechado), *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) e em perfusão de células. Estes métodos e estas composições são particularmente úteis para a cultura em grande escala, p. ex., cultura *batch* (sistema fechado), *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) e em perfusão de células animais, p. ex. células de mamífero. A invenção fornece um meio de cultura de células compreendendo entre 7 mM e 30 mM de leucina, entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de lisina, entre 7 mM e 30 mM de treonina, entre 7 mM e 30 mM de prolina e entre 7 mM e 30 mM de valina. A invenção fornece ainda um método de

produção de um polipéptido numa cultura de células compreendendo:

(1) o fornecimento de uma cultura de células, compreendendo:

a. células, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse; e

b. um meio de cultura de células compreendendo entre 7 mM e 30 mM de leucina, entre cerca de 7 mM e cerca de 30 mM de lisina, entre 7 mM e 30 mM de treonina, entre 7 mM e 30 mM de prolina e entre 7 mM e 30 mM de valina; e

(2) a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse.

Um meio concebido racionalmente da presente divulgação contém uma concentração de um aminoácido que é calculada para a utilização na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células, e uma concentração do aminoácido que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse.

Numa forma de realização, a divulgação fornece um método de produção de um polipéptido numa cultura de células compreendendo o fornecimento de uma cultura de células, compreendendo células, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse, e um meio de cultura de células desejado, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para a utilização na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células, e uma concentração do aminoácido que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse; e a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse. Numa forma de realização da divulgação, o meio de cultura de células desejado compreende uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de acordo com a fórmula

$A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, P corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido, M corresponde a um multiplicador para uma densidade celular máxima desejada da cultura de células, N corresponde a um multiplicador para uma concentração desejada do polipéptido de interesse, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base.

Noutra forma de realização, a divulgação fornece um método de produção de um polipéptido numa cultura de células, compreendendo o fornecimento de uma cultura de células, compreendendo células, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse; e um meio de cultura de células inicial, em que o volume do meio de cultura de células inicial é de cerca de 60 a 99% do volume de um volume do meio de cultura de células desejado; o fornecimento de um meio de cultura de células de alimentação à cultura de células, em que o volume do meio de cultura de células de alimentação é de cerca de 1 a 40% do volume do meio de cultura de células desejado, e em que o meio de cultura de células desejado resultante compreende uma concentração de um aminoácido que é calculado para a utilização na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células, e uma concentração do aminoácido que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse; e a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse. Numa forma de realização da invenção, o meio de cultura de células desejado resultante compreende uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma

concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, P corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido, M corresponde a um multiplicador para uma densidade celular máxima desejada da cultura de células, N corresponde a um multiplicador para uma concentração desejada do polipéptido de interesse, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base; e a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse. Noutra forma de realização da invenção, o meio de cultura de células inicial compreende uma concentração, B, do aminoácido de acordo com a fórmula $B = [A - (Z * V)] / (1 - V)$, em que Z corresponde a uma concentração do aminoácido no meio de cultura de células de alimentação, e V corresponde a um volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume do meio de cultura de células desejado. Noutra forma de realização dos métodos aqui divulgados, Y corresponde a um valor de 0 a cerca de 1,5. Noutra forma de realização ainda dos métodos aqui divulgados, F corresponde a um valor de cerca de 1 a cerca de 1,5. Numa outra forma de realização dos métodos aqui divulgados, Y corresponde a uma valor de 0 a cerca de 1,5 e F corresponde a um valor de 1 a cerca de 1,5.

Numa forma de realização dos métodos aqui divulgados, o meio de cultura de células desejado compreende um valor igual ou superior a 3 mM de tirosina. Noutras formas de realização dos métodos aqui divulgados, o meio de cultura de células desejado 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 valina. Numa outra forma de realização dos métodos aqui divulgados, a

concentração combinada de leucina, lisina, treonina, prolina e valina no meio de cultura de células desejado corresponde a um valor entre cerca de 35 mM e cerca de 150 mM. Noutra forma de realização ainda, a concentração combinada de leucina, lisina, treonina e valina no meio de cultura de células desejado corresponde a um valor entre cerca de 60% e cerca de 80% da concentração dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura de células desejado.

Numa forma de realização dos métodos aqui divulgados, a concentração combinada dos aminoácidos essenciais no meio de cultura de células desejado corresponde a um valor entre cerca de 30% e cerca de 50% da concentração dos aminoácidos totais no meio de cultura de células desejado. Noutra forma de realização dos métodos aqui divulgados, a concentração dos aminoácidos no meio de cultura de células desejado corresponde a um valor entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM. Numa outra forma de realização dos métodos aqui divulgados, a concentração de prolina na cultura de células é mantida num valor superior a cerca de 1 mM. Noutra forma de realização ainda dos métodos aqui divulgados, a concentração de prolina na cultura de células é mantida num valor superior a cerca de 2 mM. Em algumas formas de realização dos métodos de produção de um polipéptido, a cultura de células é uma cultura de células em grande escala. Noutras formas de realização, as células são células animais.

Um outro aspeto da divulgação fornece polipéptidos produzidos de acordo com os métodos aqui divulgados. Outro aspeto da invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende um polipéptido produzido de acordo com os métodos aqui divulgados e um portador farmacêuticamente aceitável.

Um outro aspeto da divulgação fornece um método de cultura de células compreendendo: o fornecimento de uma cultura de células compreendendo: células; e um meio de

cultura de células desejado, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para a utilização na massa celular e uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células; e a manutenção da cultura de células em condições que permitem o crescimento e a replicação das células na cultura de células. Numa forma de realização da invenção, o meio de cultura de células desejado compreende uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, M é um multiplicador para uma densidade celular máxima desejada da cultura de células, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base. Em algumas formas de realização dos métodos de cultura de células, a cultura de células é uma cultura de células em grande escala. Noutras formas de realização, as células são células animais.

Um outro aspeto da divulgação fornece um meio de cultura de células, compreendendo uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM. Outro aspeto da divulgação fornece um meio de cultura de células para a utilização na produção de um polipéptido de interesse, compreendendo uma concentração total de aminoácidos entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM.

Outro aspeto da divulgação fornece um meio de cultura de células para a utilização na produção de um polipéptido de interesse, compreendendo uma concentração de um aminoácido que é calculada para a utilização na massa celular, uma concentração do aminoácido que é calculada para a utilização na manutenção de células, e uma concentração do aminoácido que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse. Numa forma de realização da invenção, o meio de cultura de células para a

utilização na produção de um polipéptido de interesse compreende uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A , de acordo com a fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, P corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido, M corresponde a um multiplicador para a densidade celular máxima desejada da cultura de células, N corresponde a um multiplicador para a concentração desejada do polipéptido de interesse, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base.

Outro aspeto ainda da divulgação fornece um meio de cultura de células, compreendendo uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, M é um multiplicador para a densidade celular máxima desejada da cultura de células, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base. Em algumas formas de realização, o meio de cultura de células é um meio de cultura de células em grande escala. Noutras formas de realização, o meio de cultura de células é um meio de cultura de células animais.

Outro aspeto ainda da divulgação fornece um método para determinar uma concentração otimizada de um aminoácido utilizado num meio de cultura de células para a produção de um polipéptido de interesse numa cultura de células, compreendendo: a determinação da concentração de aminoácido necessária para a massa celular das células na cultura de células numa densidade celular-alvo; a determinação da concentração de aminoácido necessária para produzir o

polipéptido de interesse na cultura de células num título de polipéptido-alvo; a determinação da concentração de aminoácido necessária para a manutenção das células na cultura de células; e a adição das concentrações para fornecer uma concentração otimizada do aminoácido utilizado no meio de cultura de células para a produção do polipéptido de interesse na cultura de células.

Um outro aspeto da divulgação fornece um método para determinar uma concentração de aminoácido otimizada, A, de um aminoácido utilizado num meio de cultura de células para a produção de um polipéptido de interesse numa cultura de células, compreendendo: a determinação da concentração de aminoácido, X, necessária para a massa celular das células numa densidade celular definida; a determinação da concentração de aminoácido, P, necessária para produzir o polipéptido de interesse num título de polipéptido definido; 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 corresponde a um multiplicador para uma densidade celular-alvo desejada da cultura de células, N corresponde a um multiplicador para uma concentração-alvo desejada do polipéptido de interesse, Y corresponde a um fator de manutenção de células; e F corresponde a um fator de linha de base. Em algumas formas de realização dos métodos para determinar uma concentração de aminoácido otimizada, a cultura de células é uma cultura de células em grande escala. Noutras formas de realização, as células são células animais.

Outras funcionalidades e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e reivindicações apresentadas em seguida.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1** representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar

anti-IL-22. As células foram cultivadas no meio racionalmente concebido do Exemplo 2.

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

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

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

A **Figura 5** representa o título (eixo Y; "Título (g/L)") de anticorpo anti-IL-22 ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio Tradicional" (um meio baseado nos requisitos de cultura de células tradicional, consulte, p. ex., o Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568), "Meio de Conceção Racional" preparado utilizando os métodos aqui apresentados ou "Meio Tradicional + Prolina", que contém uma prolina adicional de 3,7 mM adicionada ao "Meio Tradicional" (consulte o Exemplo 4).

A **Figura 6** representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio Tradicional", "Meio de Conceção Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (consulte o Exemplo 4).

A **Figura 7** representa a viabilidade celular (eixo Y; "Viabilidade [%]") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio Tradicional", "Meio de Conceção Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (consulte o Exemplo 4).

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) ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio Tradicional", "Meio de Conceção Racional" ou "Meio Tradicional + Prolina" (consulte o Exemplo 4).

A **Figura 9** representa a densidade celular (eixo Y; "Densidade Celular (10^6 células/mL)") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio de Conceção Racional" ou "Meio de Conceção Racional sem manutenção e fatores de linha de base". A figura é representativa de 5 duplicados independentes (n=5) (consulte o Exemplo 6).

A **Figura 10** representa a viabilidade celular (eixo Y: "Viabilidade (%)") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio de Conceção Racional" ou "Meio de Conceção Racional sem manutenção e fatores de linha de base". A figura é representativa de 5 duplicados independentes (n=5) (consulte o Exemplo 6).

A **Figura 11** representa o título de anticorpo (eixo Y; "Título (g/L)") ao longo do tempo (eixo X; "Dias") para células CHO produzidas para expressar anti-IL-22. As células foram cultivadas no "Meio de Conceção Racional" ou "Meio de Conceção Racional sem manutenção e fatores de

linha de base". A figura é representativa de 5 duplicados independentes (n=5) (consulte o Exemplo 6).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O termo "cultura *batch*" conforme aqui utilizado refere-se a um método de cultura de células no qual todos os componentes que serão, em última análise, utilizados na cultura de células, incluindo o meio, bem como as próprias células, são fornecidos no início do processo de cultura. Uma cultura *batch* (sistema fechado) é habitualmente parada num determinado momento e as células e/ou os componentes no meio são colhidos e opcionalmente purificados.

O termo "cultura *fed-batch*" conforme aqui utilizado refere-se a um método de cultura de células no qual os componentes adicionais são fornecidos à cultura em algum momento subsequente ao início do processo de cultura. Os componentes fornecidos compreendem habitualmente suplementos nutritivos para as células que foram reduzidas durante o processo de cultura. Uma cultura *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) é habitualmente parada num determinado momento e as células e/ou os componentes no meio são colhidos e opcionalmente purificados. Numa forma de realização preferida da presente invenção, a cultura de células é uma cultura de células animais, p. ex., uma cultura de células de mamífero, que é uma cultura *batch* (sistema fechado) ou *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo).

O termo "cultura em perfusão" conforme aqui utilizado refere-se a um método de cultura de células no qual os componentes adicionais são fornecidos de forma contínua ou semicontínua à cultura a seguir ao início do processo de cultura. Os componentes fornecidos compreendem habitualmente suplementos nutritivos para as células que foram reduzidas no processo de cultura. As partes das células e/ou dos componentes no meio são habitualmente

colhidas numa base contínua ou semicontínua e são opcionalmente purificadas.

O termo "biorreator" conforme aqui utilizado refere-se a qualquer recipiente utilizado para o crescimento de uma cultura de células procarióticas ou eucarióticas, p. ex., uma cultura de células animais (tal como uma cultura de células de mamífero). O biorreator pode ter qualquer tamanho, desde que seja útil para a cultura de células, p. ex., células de mamífero. Habitualmente, o biorreator corresponderá, pelo menos, a 30 ml e poderá corresponder a 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros ou mais, ou a qualquer volume intermédio. As condições internas do biorreator, incluindo, mas não se limitando a, pH e temperatura, são geralmente controladas durante o período de cultura. O biorreator pode ser composto por qualquer material que seja adequado para manter as culturas de células de mamíferos suspensas nos meios nas condições de cultura da presente invenção, incluindo vidro, plástico ou metal. O termo "biorreator de produção" conforme aqui utilizado refere-se ao biorreator final utilizado na produção do polipéptido ou da proteína de interesse. O volume de um biorreator de produção de cultura de células em grande escala é geralmente superior a cerca de 100 ml, habitualmente de pelo menos cerca de 10 litros, e pode corresponder a 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros ou mais, ou qualquer volume intermédio. Um perito na técnica terá conhecimento de, e poderá escolher, biorreatores adequados para a utilização na aplicação da presente invenção.

Os termos "densidade celular", "concentração celular" ou afins, conforme aqui utilizado, referem-se ao número, ao peso, à massa, etc. das células presentes num determinado volume de meio. A "densidade celular máxima" ou afins refere-se ao número máximo de células que pode ser alcançado num determinado volume de meio, e "densidade

celular máxima desejada" ou afins refere-se ao número máximo de células que um praticante pretende obter (p. ex., alvos) num determinado volume de células. As variações desses valores-alvo serão claras para os peritos na técnica, p. ex., um perito na técnica pode expressar valores-alvo em termos de massa celular desejada, e esses valores-alvo podem encontrar-se numa ou em mais unidades de medição apropriadas (p. ex., unidades máximas desejadas de massa celular).

O termo "viabilidade celular" conforme aqui utilizado refere-se à capacidade de sobrevivência das células da cultura num determinado conjunto de condições de cultura ou variações experimentais. O termo conforme aqui utilizado refere-se igualmente a essa parte das células que se encontram vivas num determinado momento em relação ao número total de células, vivas e mortas, na cultura nesse momento.

Os termos "cultura" e "cultura de células" conforme aqui utilizados referem-se a uma população de células que se encontra suspensa num meio de cultura de células em condições adequadas para a sobrevivência e/ou o crescimento da população de células. Conforme aqui utilizados, estes termos podem referir-se à combinação que compreende a população de células (p. ex., a cultura de células animais) e o meio no qual a população é suspensa.

O termo "densidade de células viáveis integradas" ou "IVC" conforme aqui utilizado refere-se à densidade média de células viáveis no decorrer da cultura multiplicada pela quantidade de tempo da duração da cultura. Partindo do princípio de que a quantidade de polipéptido e/ou proteína produzida é proporcional ao número de células viáveis presente no decorrer da cultura, a densidade de células viáveis integradas é uma ferramenta útil para estimar a quantidade de polipéptido e/ou proteína produzida no decorrer da cultura.

Os termos "meio", "meio de cultura de células" e "meio de cultura", conforme aqui utilizados, referem-se a uma solução que contém nutrientes que alimentam as células animais em crescimento, p. ex., de mamífero. Habitualmente, estas soluções fornecem aminoácidos, vitaminas, fontes de energia, lípidos e oligoelementos essenciais e não essenciais necessários por parte da célula para sobrevivência e/ou crescimento mínimo. A solução também pode conter componentes que melhoram o crescimento e/ou a sobrevivência acima da taxa mínima, incluindo hormonas e fatores de crescimento. A solução é preferencialmente formulada para uma concentração de pH e sal ideal para a proliferação e sobrevivência das células. Numa forma de realização, o meio é um meio definido. Os meios definidos são meios nos quais todos os componentes têm uma estrutura química conhecida. Noutra forma de realização da invenção, o meio pode conter aminoácidos derivados de qualquer fonte ou método conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando a, aminoácidos derivados de adições únicas de aminoácido ou de hidrolisado de proteína ou peptona (incluindo adições de fontes animais ou vegetais).

O termo "semeadura" conforme aqui utilizado refere-se ao processo de fornecimento de uma cultura de células a um biorreator ou outro recipiente. As células podem ter sido propagadas anteriormente noutro biorreator ou recipiente. Em alternativa, as células podem ter sido congeladas e descongeladas antes de, p. ex. imediatamente antes de, fornecer as mesmas ao biorreator ou recipiente. O termo refere-se a qualquer número de células, incluindo uma única célula.

O termo "título" conforme aqui utilizado refere-se à quantidade total de polipéptido de interesse produzida por uma cultura de células animais, dividida por uma determinada quantidade de volume do meio; deste modo, "título" refere-se a uma concentração. O título é

habitualmente expressado em unidades de miligramas de polipéptido por mililitro de meio.

Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo" inclui uma proteína compreendendo, pelo menos, um e tipicamente dois domínios VH ou partes dos mesmos, e pelo menos um e tipicamente dois domínios VL ou partes dos mesmos. Em determinadas formas de realização, o anticorpo é um tetramero de duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina, em que as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina são interligadas, p. ex., por ligações dissulfureto. Os anticorpos, ou uma parte dos mesmos, podem ser obtidos a partir de qualquer origem, incluindo, mas não se limitando a, roedor, primata (p. ex., primata humano e não humano), camelo, etc., ou podem ser produzidos de forma recombinante, p. ex., quimérica, humanizada e/ou gerada *in vitro*, p. ex., através de métodos bem conhecidos dos peritos na técnica.

Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos no termo "fragmento de ligação ao antigénio" de um anticorpo incluem, mas não se limitam a, (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfureto na região de charneira; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb que consiste num domínio VH; (vi) um domínio variável de cadeia pesada de camelo ou transformada de camelo (VHH); (vii) uma cadeia única Fv (scFv; consulte abaixo); (viii) um anticorpo biespecífico; e (ix) um ou mais fragmentos de uma molécula de imunoglobulina fundidos numa região Fc. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, através de um

ligante sintético que permite que os mesmos sejam produzidos como uma cadeia única de proteína na qual as regiões VL e VH se juntam para formar moléculas monovalentes (conhecida como cadeia única Fv (scFv)); consulte, p. ex., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423 a 26; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 85:5879 a 83). Igualmente, é pretendido que esses anticorpos de cadeia única estejam abrangidos no termo "fragmento de ligação ao antigénio" de um anticorpo. Estes fragmentos podem ser obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas dos peritos na técnica, e os fragmentos são avaliados relativamente à função da mesma maneira que os anticorpos intactos.

O "fragmento de ligação ao antigénio" pode, opcionalmente, incluir ainda uma porção que melhora uma ou mais entre, p. ex., estabilidade, função de célula efetora ou fixação de complemento. Por exemplo, o fragmento de ligação ao antigénio pode ainda incluir uma porção peguilada, albumina, ou uma região constante de cadeia pesada e/ou leve.

Para além de anticorpos "biespecíficos" ou "bifuncionais", um anticorpo é compreendido como tendo cada um dos respetivos locais de ligação idênticos. Um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" é um anticorpo híbrido artificial com dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois locais de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos através de uma variedade de métodos, incluindo a fusão de hibridomas ou a ligação de fragmentos Fab'. Consulte, p. ex., Songsivilai e Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315 a 21; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1547 a 53.

A expressão "proteína" ou "produto de proteína" refere-se a uma ou mais cadeias de aminoácidos. Conforme aqui utilizado, o termo "proteína" é sinónimo de "polipéptido" e, como é geralmente compreendido na técnica,

refere-se pelo menos a uma cadeia de aminoácidos ligada através de ligações de péptidos sequenciais. Em determinadas formas de realização, uma "proteína de interesse" ou um "polipéptido de interesse" é uma proteína codificada por uma molécula exógena de ácido nucleico que foi transformada numa célula hospedeira. Em determinadas formas de realização, em que a "proteína de interesse" é codificada por um ADN exógeno com o qual a célula hospedeira foi transformada, a sequência de ácido nucleico do ADN exógeno determina a sequência de aminoácidos. Em determinadas formas de realização, uma "proteína de interesse" é uma proteína codificada por uma molécula de ácido nucleico que é endógena em relação à célula hospedeira. Em determinadas formas de realização, a expressão de uma proteína endógena de interesse assim é alterada mediante a transfeção de uma célula hospedeira com uma molécula exógena de ácido nucleico que pode, por exemplo, conter uma ou mais sequências reguladoras e/ou codificar uma proteína que melhora a expressão da proteína de interesse. Os métodos e as composições da presente invenção podem ser utilizados para produzir qualquer proteína de interesse, incluindo, mas não se limitando a, proteínas com propriedades farmacêuticas, diagnósticas, agrícolas e/ou quaisquer umas de uma variedade de outras propriedades que são úteis em aplicações comerciais, experimentais e/ou outras. Além disso, uma proteína de interesse pode ser uma proteína terapêutica. Nomeadamente, uma proteína terapêutica é uma proteína que tem um efeito biológico numa região do corpo na qual o mesmo atua, ou numa região do corpo na qual o mesmo atua remotamente através de intermediários. Os exemplos de terapêutica de proteínas são descritos abaixo em mais detalhe. Em determinadas formas de realização, as proteínas produzidas utilizando métodos e/ou composições da presente invenção podem ser processadas e/ou modificadas. Por exemplo, uma

proteína para ser produzida de acordo com a presente invenção pode ser glicosilada.

A presente invenção pode ser utilizada para células de cultura para a produção vantajosa de qualquer proteína terapêutica, tais como enzimas, recetores, anticorpos (p. ex., anticorpos monoclonais e/ou policlonais), proteínas de fusão Fc, citocinas, hormonas, fatores reguladores, fatores de crescimento, fatores de coagulação/coagulabilidade, agentes de ligação ao antigénio, etc. relevantes de forma farmacêutica ou comercial. Um perito na técnica terá conhecimento de outras proteínas que podem ser produzidas de acordo com a presente invenção, e será capaz de utilizar métodos aqui divulgados para produzir essas proteínas.

Construções de Expressão e Geração de Células Hospedeiras Recombinantes

A presente invenção utiliza células hospedeiras recombinantes, p. ex., células procarióticas ou eucarióticas, isto é, células transfetadas com uma construção de expressão contendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse. A expressão "células animais" abrange células de invertebrado, de vertebrado não mamífero (p. ex., aviário, réptil e anfíbio) e de mamífero. Os exemplos não limitativos de células de invertebrado incluem as seguintes células de inseto: *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori* (bicho-da-seda/sirgo).

Uma quantidade de linhas celulares de mamífero são células hospedeiras adequadas para a expressão recombinante de polipéptidos de interesse. As linhas de células hospedeiras de mamífero incluem, por exemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L cells, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murinos (p.

ex., SP2/0 e NS0) e células C2C12, bem como linhas celulares transformadas de primata, hibridomas, células diploides normais, e estirpes de células derivadas de cultura *in vitro* de tecido primário e explantes primários. Qualquer célula eucariótica que seja capaz de expressar o polipéptido de interesse pode ser utilizada nos métodos de conceção de meios divulgados. Numerosas linhas celulares estão disponíveis a partir de fontes comerciais, tais como a Coleção Americana de Culturas Celulares (ATTC - American Type Culture Collection). Numa forma de realização da invenção, a cultura de células, p. ex., a cultura de células em grande escala, utiliza células de hibridoma. A construção de células de hibridoma de produção de anticorpos é bem conhecida na técnica. Numa forma de realização da invenção, a cultura de células, p. ex., a cultura de células em grande escala, utiliza células CHO.

Em alternativa, pode ser possível produzir de forma recombinante polipéptidos de interesse em eucariotas inferiores, tais como levedura, ou em procariotas, tais como bactérias. As estirpes de levedura adequadas incluem as estirpes *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida*, ou qualquer estirpe de levedura capaz de expressar o polipéptido de interesse. As estirpes bacterianas adequadas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, ou qualquer estirpe bacteriana capaz de expressar o polipéptido de interesse. A expressão nas bactérias pode resultar na formação de corpos de inclusão que incorporam a proteína recombinante. Deste modo, o redobramento da proteína recombinante pode ser necessário para produzir material ativo ou mais ativo. Diversos métodos para obter proteínas heterólogas corretamente dobradas a partir de corpos de inclusão bacterianos são conhecidos na técnica. Estes métodos envolvem geralmente a solubilização da proteína a partir dos corpos de inclusão e, em seguida, a desnaturação

completa da proteína utilizando um agente caotrópico. Quando estão presentes resíduos de cisteína na sequência de aminoácidos primária da proteína, é muitas vezes necessário realizar o redobramento num ambiente que permite a formação correta de ligações dissulfureto (um sistema redox). Os métodos gerais de redobramento são divulgados em Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187 a 95, EP 0433225, e Patente U.S. n.º 5.399.677.

A presente invenção utiliza construções, na forma de plasmídeos, vetores e cassetes de transcrição ou expressão, constituídas por, pelo menos, um polinucleótido que codifica um polipéptido de interesse. Os vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais se encontram ligados de modo funcional. Esses vetores são aqui referidos como "vetores de expressão recombinante" ou "vetores de expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade nas técnicas de ADN recombinante encontram-se muitas vezes na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser utilizados alternadamente, uma vez que o plasmídeo é a forma de vetor mais comum. Contudo, a invenção pretende incluir outras formas de vetores de expressão que servem funções equivalentes, incluindo, mas não se limitando a, vetores virais (p. ex., retrovírus defeituosos de replicação, alfavírus, adenovírus e vírus adeno-associados modificados).

As construções que são adequadas para a expressão de proteínas nas células animais são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, os polinucleótidos podem ser ligados de modo funcional a uma sequência de controlo de expressão, tais como as presentes nos vetores de expressão pMT2 ou pED divulgados, p. ex., em Kaufman *et al.* (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4485 a 90. Outras sequências de controlo de expressão adequadas são verificadas em vetores conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a: HaloTag™ pHT2,

pACT, pBIND, pCAT®3, pCI, phRG, phRL (Promega, Madison, WI); pcDNA3.1, pcDNA3.1-E, pcDNA4/HisMAX, pcDNA4/His-MAX-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, pDNRCMV (Clontech, Palo Alto, CA); e pSMEDA (Wyeth, Madison, WI). Os métodos gerais de expressão de proteínas recombinantes são igualmente conhecidos e são exemplificados, p. ex., em Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:537 a 66.

Conforme aqui definido, "ligado de modo funcional" significa ligado de forma enzimática ou química para formar uma ligação covalente entre o polinucleótido a ser expressado e a sequência de controlo de expressão, de maneira a que a proteína codificada seja expressada pela célula hospedeira transfetada.

As construções de expressão recombinante da invenção podem incluir sequências adicionais, tais como sequências reguladoras (p. ex., sequências que regulam a replicação de vetores (p. ex., origens de replicação, a transcrição da sequência de ácidos nucleicos que codifica o polipéptido (ou péptido) de interesse) ou a expressão do polipéptido codificado), sequências de caudas (*tag*), tais como histidina, e genes de marcador selecionável. O termo "sequência reguladora" pretende incluir promotores, intensificadores e quaisquer outros elementos de controlo de expressão (p. ex., sinais de poliadenilação, locais de *splice* de transcrição) que controlem a transcrição, a replicação ou a tradução. Essas sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA (1990). Os peritos na técnica irão reconhecer que a conceção do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, dependerá de vários fatores, incluindo a escolha da célula hospedeira e do nível de

expressão de proteínas desejada. As sequências reguladoras preferidas para a expressão de proteínas em células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que direcionam níveis elevados de expressão de proteínas, tais como promotores e/ou intensificadores derivados do promotor FF-1a e poli A BGH, citomegalovírus (CMV) (p. ex., o intensificador/promotor CMV), vírus simiano 40 (SV40) (p. ex., o intensificador/promotor SV40), adenovírus (p. ex., o maior promotor tardio de adenovírus (AdMLP)) e poliomá. Os elementos reguladores virais, e as sequências dos mesmos, são descritos, p. ex., nas Patentes U.S. n.º 5.168.062; 4.510.245; e 4.968.615.

Os vetores adequados, que contêm sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências de promotores, sequências de terminadores, sequências de poliadenilação, sequências de intensificadores, sequências de genes marcadores e outras, conforme apropriado, podem ser escolhidos ou construídos. A expressão induzida de proteínas, alcançada utilizando vetores com sequências de promotores induzidas, tais como vetores induzidos por tetraciclina, p. ex., pTet-On™ e pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA), também pode ser utilizada no método divulgado. Para obter mais detalhes relativamente aos vetores de expressão, consulte, 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 nucleicos, por exemplo, na preparação de construções de ácido nucleico, na mutagénese, na sequenciação, na introdução de ADN nas células, na expressão de genes e na análise de proteínas, também são descritos em detalhe em "Current Protocols in Molecular Biology" (2ª ed.) eds. Ausubel et al., Wiley & Sons, Alameda, CA (1992).

Um polinucleótido inserido numa construção de expressão para produzir um polipéptido de interesse pode codificar qualquer polipéptido que seja capaz de ser expressado na célula hospedeira utilizada na cultura de células. Deste modo, o polinucleótido pode codificar produtos de genes completos, partes de genes completos, péptidos ou proteínas de fusão. Esses polinucleótidos podem consistir em ADNc ou ADN genómico, e podem ser derivados de qualquer animal. Os polinucleótidos podem ser isolados de células ou organismos através de métodos conhecidos na técnica, p. ex., PCR ou RT-PCR, ou podem ser produzidos através de métodos de síntese química convencionais conhecidos. Esses polinucleótidos quimicamente sintéticos podem ter propriedades biológicas em comum com polinucleótidos naturais e, deste modo, podem ser utilizados como substitutos de polinucleótidos naturais.

Os polipéptidos também podem ser produzidos de forma recombinante ligando de modo funcional o polinucleótido que codifica o polipéptido de interesse às sequências de controlo adequadas num ou em mais vetores de expressão de insetos, tais como vetores de baculovírus, e utilizando um sistema de expressão de células de inseto. Os materiais e métodos para os sistemas de expressão de baculovírus/Sf9 encontram-se disponíveis comercialmente em forma de *kit* (p. ex., o *kit* MAXBAC®, Invitrogen, Carlsbad, CA).

A transfeção de células hospedeiras, p. ex., células animais, com a construção de expressão pode ser alcançada através de muitos métodos que são bem conhecidos na técnica. As células podem ser transfetadas de modo transitório ou transfetadas de modo estável. Existem diversos métodos bem estabelecidos para a distribuição de moléculas, particularmente ácidos nucleicos, nas células hospedeiras, p. ex., células animais. Dependendo do tipo de célula, da transfeção desejada (isto é, transitória ou estável), e dos requisitos experimentais específicos, tais

como a transfeção de linhas celulares difíceis ou células primárias, o tipo de molécula transfetado (ADN genómico, ADN, oligonucleótidos) ou a construção de expressão escolhida, cada método de transferência tem vantagens e desvantagens conhecidas dos peritos na técnica. Os métodos de transfeção comuns incluem, p. ex., precipitação de fosfato de cálcio, transfeção mediada por lipossoma, transfeção mediada por DEAE Dextrano, bombardeamentos de genes, eletroporação, distribuição de nanopartículas, poliaminas, epissomas e polietileniminas. Além disso, muitos *kits* de transfeção e reagentes encontram-se comercialmente disponíveis a partir de empresas, tais como Invitrogen (VOYAGER™, LIPOFECTIN®), EMD Biosciences, San Diego, CA (GENEJUICE™), Qiagen, Germantown, MD (SUPERFECT™), Orbigen, San Diego, CA (SAPPHIRE™), e muitos outros conhecidos dos peritos na técnica. Os protocolos de transfeção também podem ser encontrados em "Basic Methods in Molecular Biology" (2ª ed.) eds. Davis et al., Appleton e Lange, CT (1994).

A presente invenção utiliza culturas de células, p. ex., culturas de células animais em grande escala, para produzir grandes quantidades do polipéptido de interesse. Os métodos para transfeções transitórias em grande escala são divulgados 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 a 77; Maiorella et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1406 a 10; Baldi et al., *supra*; Lan Pham et al., *supra*; Meissner et al., *supra*; Durocher et al., *supra*). Em geral, a expressão de genes transitória em grande escala em culturas de células de mamífero pode utilizar qualquer um de diversos tipos comuns de modos de transfeção, p. ex., polietilenimina, impulso de campo elétrico, CALFECTION™ ou fosfato de cálcio, para alcançar uma eficiência de transfeção elevada em escalas ou volumes

desejados, p. ex., superior a 10 litros (Derouazi et al., *supra*; Rols et al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206(1):115 a 21; Wurm e Bernard (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(2):156 a 59; Schlaeger e Christensen (1999) *Cytotechnology* 30(1-3):71 a 83; Jordan et al. (1998) *Cytotechnology* 26(1):39 a 47; Lindell et al. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1676(2):155 a 61). Geralmente, estas culturas em grande escala desenvolvem-se em biorreatores, agitadores ou incubadoras com chapas de agitação, e também podem ser conhecidas como culturas "giratórias" ou "em suspensão". Deste modo, em oposição às transfeções tradicionais, nas quais as células se encontram ligadas a chapas ou frascos, os métodos divulgados utilizam geralmente culturas em suspensão. As culturas de células em grande escala são geralmente consideradas como sendo culturas de células que têm um volume superior a cerca de 100 ml.

Em alguns casos, as linhas celulares que expressam o polipéptido de interesse podem ser, em primeiro lugar, produzidas e, em seguida, utilizadas para semear uma cultura de células em grande escala. As linhas celulares estáveis que expressam uma proteína de interesse podem ser produzidas através de vários métodos bem conhecidos, incluindo os métodos utilizados para a transfeção transitória aqui divulgada. Em geral, as linhas celulares estáveis são produzidas mediante crescimento a longo prazo e seleção em meios definidos quimicamente. Por exemplo, as células transfetadas (p. ex., por precipitação de fosfato de cálcio ou transfeção de lipossoma) com um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse podem ser transfetadas em simultâneo com um vetor que inclui um gene de resistência de neomicina, que confere resistência à neomicina/geneticina (G418). Em seguida, as células transfetadas desenvolvem-se em meios que contêm G418, e as células sobreviventes expandem-se mediante clonagem para produzir uma linha celular que se expressa de modo estável.

As alíquotas desta linha celular podem depois ser utilizadas para semear uma cultura em grande escala e para produzir grandes quantidades da proteína de interesse.

A transfeção de células necessita da otimização de diversas variáveis, incluindo a densidade de semeadura de células (p. ex., cerca de 1×10^5 a cerca de 3×10^6 células/ml de cultura), a concentração de soro (p. ex., 0 a 10%), a temperatura de incubação (p. ex., cerca de 20 a 38 °C), o veículo de transfeção ou reagente (químico ou elétrico), o volume de cultura (p. ex., cerca de 5 ml a 20 litros) e o tempo de incubação (p. ex., cerca de 24 a 144 horas). Os parâmetros ideais variam para cada tipo de célula. Contudo, os fornecedores comerciais fornecem geralmente diretrizes de otimização para a transfeção de determinados tipos de célula, tal como várias referências conhecidas dos peritos na técnica que utilizam a transfeção da célula hospedeira escolhida. Estas fontes podem ser utilizadas para direccionar a transfeção da célula hospedeira escolhida, ou podem ser utilizadas como um ponto inicial a partir do qual pode ser utilizado um método de tentativas simples para fornecer parâmetros de transfeção ideais.

Cultura de Células

Os procedimentos típicos para produzir um polipéptido de interesse incluem culturas *batch* (sistema fechado) e culturas *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo). Os processos de cultura *batch* (sistema fechado) compreendem tradicionalmente a inoculação de uma cultura de produção em grande escala com uma cultura de sementes de uma determinada densidade celular, o crescimento das células em condições que conduzem à viabilidade e ao crescimento celular, a colheita da cultura quando as células atingem uma densidade celular especificada e a purificação do polipéptido expressado. Os procedimentos de cultura *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) incluem uma etapa ou

etapas adicionais de complementação da cultura *batch* (sistema fechado) com nutrientes e outros componentes que são consumidos durante o crescimento das células. Um perito na técnica irá reconhecer que a presente invenção pode ser utilizada em qualquer sistema no qual as células são cultivadas incluindo, mas não se limitando a, sistemas *batch* (sistema fechado), *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) e em perfusão. Em determinadas formas de realização preferidas da presente invenção, as células desenvolvem-se em sistemas *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo).

Um problema persistente e por resolver com as culturas tradicionais, p. ex., culturas *batch* (sistema fechado) e *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo), é a produção de produtos de resíduos metabólicos, que têm efeitos prejudiciais no crescimento e na viabilidade celular, bem como na produção de polipéptidos expressados. Dois produtos de resíduos metabólicos que têm efeitos particularmente prejudiciais são lactato e amónio, que são produzidos como um resultado do metabolismo de glicose e glutamina, respetivamente. Além da produção enzimática de amónio como um resultado do metabolismo de glutamina, o amónio também se acumula nas culturas de células como um resultado de degradação não metabólica ao longo do tempo.

As formulações de meios tradicionais, incluindo meios comercialmente disponíveis, tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma), contêm níveis relativamente elevados de glicose e glutamina (o último em comparação com outros aminoácidos). Anteriormente, partia-se do princípio de que estes componentes eram abundantemente necessários, uma vez que correspondem às fontes de energia metabólica primárias para as células. Contudo, o rápido consumo destes nutrientes origina a acumulação de lactato e amónio conforme descrito

acima. Adicionalmente, altos níveis iniciais de glicose e glutamina e a acumulação subsequente de lactato e amónio resultam em osmolaridade elevada, uma condição que é, por si própria, muitas vezes prejudicial para o crescimento celular, a viabilidade celular e a produção de polipéptidos. O meio concebido racionalmente aqui divulgado pode ser modificado para diminuir a acumulação de produtos metabólicos nocivos. Essas modificações podem ser encontradas, p. ex., nos Pedidos de Patente Publicados U.S. n.º 2005/0070013 (fornecimento de glicose restrito) e 2006/0121568 (modificações de teor de aminoácido e relações).

Formulações e Conceção Racional de Meios

As 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 50:50 de meio de Eagle Modificado por Dulbecco e meio F12 de Ham) tem um teor total de aminoácido de 7,29 mM, e o meio de cultura de células tradicional conhecido como RPMI-1640 tem um teor total de aminoácido de 6,44 mM (consulte, p. ex., Morton (1970) *In Vitro* 6:89 a 108; Ham (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. E.U.A.* 53:288 a 93; Moore *et al.* (1967) *J. Am. Medical Assn.* 199:519 a 24). As mais recentes formulações de meios (tais como os meios divulgados no Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568) contêm níveis mais altos de aminoácidos e nutrientes. Contudo, as formulações tradicionais não se baseiam em requisitos de células calculados reais, que incluem crescimento celular, manutenção de células e, para as culturas de células utilizadas para produzir polipéptidos recombinantes, requisitos de produção. Mediante a utilização destas variáveis, são aqui fornecidos métodos de determinação de formulações de meios com concentrações muito mais altas, mas não tóxicas, de aminoácidos totais.

As formulações de meios de cultura de células, p. ex., as formulações de meios de cultura de células em grande escala, aqui descritas, quando utilizadas de acordo com, p. ex., outras etapas de cultura aqui descritas e com, p. ex., modificações, tais como as encontradas, p. ex., no Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568, otimizam a densidade celular e título de polipéptido. Uma concentração de aminoácido das formulações de meios aqui descritas baseia-se na concentração dos aminoácidos necessários para: 1) massa celular; 2) manutenção de células; e 3) produção de polipéptidos. Numa forma de realização da divulgação, um meio de cultura de células contém uma concentração dos aminoácidos que é calculada para a utilização na massa celular, uma concentração dos aminoácidos que é calculada para a utilização na manutenção de células e uma concentração dos aminoácidos que é calculada para a incorporação no polipéptido de interesse. Noutra forma de realização da divulgação, um meio de cultura de células 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 corresponde à concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, P corresponde à concentração do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido, M corresponde ao multiplicador para a massa celular desejada (isto é, as unidades máximas desejadas de massa celular), N corresponde ao multiplicador para a concentração desejada do polipéptido de interesse (isto é, título de polipéptido-alvo ou desejado, Y corresponde ao fator de manutenção de células; e F corresponde ao fator de linha de base.

A concentração, P, do aminoácido que é utilizada para a incorporação no polipéptido de interesse por unidade de título de polipéptido na fórmula acima baseia-se na estrutura primária da proteína recombinante, isto é, o teor

de aminoácido do polipéptido. Deste modo, P irá variar com base no polipéptido de interesse que será produzido através da cultura de células em grande escala. Em seguida, P pode ser convertido no requisito de aminoácido para a concentração-alvo do polipéptido de interesse utilizando N, o multiplicador para a concentração desejada do polipéptido de interesse (isto é, título de polipéptido-alvo ou desejado). Em alguns exemplos representativos da divulgação abaixo, a unidade básica de título de polipéptido é de 1 g/L. Na Tabela 1 abaixo, que contém um cálculo representativo utilizando a fórmula aqui fornecida, a concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para o polipéptido de interesse num título de 10 g/L (coluna 4) é determinada multiplicando a concentração, P, do aminoácido necessária para 1 g/L (coluna 2) pelo multiplicador, N, em que $N=10$.

Tabela 1: Determinação Representativa da Concentração de Aminoácido de Linha de Base Ajustada Necessária para o Título-Alvo de 10 g/L de Anticorpo numa Massa Celular Desejada, em que a Massa Celular Desejada é Representada pela Densidade Celular Máxima 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)
Aminoácido (AA)	Concentração de AA Necessária para Título de Anticorpo Inicial de 1 g/L	Concentração de AA Necessária para Massa Celular Representada por Célula de 10^6 Densidade de células/ml	Concentração de AA Total Necessária para Título de Anticorpo-Alvo	Concentração de AA Total Necessária para Densidade Celular Máxima Desejada de 15×10^6 células/ml (M=15)	Concentração de AA Total Necessária para Manutenção de Células (Y=100%) ou (Y=1)	Concentração de AA Total Calculada Necessária para Título de Anticorpo-Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada	Concentração de AA de linha de Base Ajustada Necessária para Título de Anticorpo-Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada (F=1,3)
			Coluna 2	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

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 E)
Aminocido	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração de
(AA)	de AA	de AA	de AA Total	de AA Total	de AA Total	de AA Total	AA de linha de
Necessária	Necessária	Necessária	Necessária para	Necessária para	Necessária	Calculada	Base Ajustada
para Título	para Massa	Título de	Densidade Celular	para	Necessária para	Necessária para	Necessária para
de Anticorpo	Celular	Anticorpo-Alvo	Máxima Desejada	Mantenção	Título de	Título de	Título de
Inicial de 1	Representada	de 10 g/L (N=10)	de 15 x 10 ⁶	de Células	Anticorpo-Alvo	Anticorpo-Alvo e	Anticorpo-Alvo e
g/L	por Célula de	10 ⁶ Densidade	(M=15)	(Y=100%) ou	e Densidade	Densidade	Densidade
	de células/ml			(Y=1)	Celular Máxima	Celular Máxima	Celular Máxima
					Desejada	Desejada	Desejada (F=1,3)
			Coluna 2	Coluna 3 x 15	Coluna 5 x 100%	(Coluna 4+5+6)	Coluna 7 x 1,3
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
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
GLX	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

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 E)
Aminocido	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração de
(AA)	de AA	de AA	de AA Total	de AA Total	de AA Total	de AA Total	AA de linha de
	Necessária	Necessária	Necessária para	Necessária para	Necessária	Calculada	Base Ajustada
	para Título	para Massa	Título de	Densidade Celular	para	Necessária para	Necessária para
	de Anticorpo	Celular	Anticorpo-Alvo	Máxima Desejada	Manutenção	Título de	Título de
	Inicial de 1	Representada	de 10 g/L (N=10)	de 15 x 10 ⁶	de Células	Anticorpo-Alvo	Anticorpo-Alvo e
	g/L	por Célula de		(M=15)	(Y=100%) ou	e Densidade	Densidade
		10 ⁶ Densidade			(Y=1)	Celular Máxima	Celular Máxima
		de células/ml				Desejada	Desejada (F=1,3)
			Coluna 2	Coluna 3 x 15	Coluna 5 x 100%	(Coluna 4+5+6)	Coluna 7 x 1,3
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
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

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 E)
Aminocido	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração de
(AA)	de AA	de AA	de AA Total	de AA Total	de AA Total	de AA Total	AA de linha de
Necessária	Necessária	Necessária	Necessária para	Necessária para	Necessária	Calculada	Base Ajustada
para Título	para Massa	Título de	Densidade Celular	para	Necessária para	Necessária para	Necessária para
de Anticorpo	Celular	Anticorpo-Alvo	Máxima Desejada	Mantenção	Título de	Título de	Título de
Inicial de 1	Representada	de 10 g/L (N=10)	de 15 x 10 ⁶	de Células	Anticorpo-Alvo	Anticorpo-Alvo e	Anticorpo-Alvo e
g/L	por Célula de	10 ⁶ Densidade	células/ml (M=15)	células/ml (N=15)	(Y=100%) ou	e Densidade	Densidade
		de células/ml			(Y=1)	Celular Máxima	Celular Máxima
					Desejada	Desejada	Desejada (F=1,3)
			Coluna 2	Coluna 3 x 15	Coluna 5 x 100%	(Coluna 4+5+6)	Coluna 7 x 1,3
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
TRP	0,16	0,04	1,64	0,56	0,56	2,75	3,58
TYR	0,35	0,12	3,48	1,78	1,78	7,03	9,14
VAL	0,74	0,23	7,36	3,50	3,50	14,36	18,67
Total (mM)	7,71	3,68	77,13	55,21	55,21	187,55	243,82

O multiplicador N pode ser calculado, p. ex., multiplicando a densidade de células viáveis integradas (IVC - Integrated Viable Cell) pela produtividade específica (qp) de uma determinada linha celular ($N = IVC \times qp$). Por exemplo, se a densidade de semente de uma determinada linha celular for de $0,8 \times 10^6$ células/ml, a densidade celular no dia 6 e dia 10 for de 15×10^6 células/ml, e a densidade celular no dia 18 for 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, $[(0,8+15)/2] \times 6$ dias + $[(15+15)/2] \times 4$ dias + $[(15+11)/2] \times 8$ dias). Se a produtividade específica média (qp) da linha celular escolhida for, p. ex., $47 \mu\text{g}/10^6$ células/dia, então $N = 10 \text{ g/L}$ no dia 18 (isto é, 211×10^6 (células/ml)*dia $\times 47 \mu\text{g}/10^6$ células/dia). Um perito na técnica irá perceber que estes cálculos podem ser efetuados com qualquer linha celular, ou que N pode ser estimado com base nas características e na origem da célula. Em alternativa, o multiplicador N não necessita de ser calculado a partir de IVC e qp, e pode simplesmente ser um título-alvo razoável para uma determinada cultura de células. Um exemplo profético, que descreve o cálculo de IVC e qp, e a outra seleção de valores N e M razoáveis são fornecidos como o Exemplo 5 (abaixo).

Conforme aqui utilizado, "massa celular", "densidade celular" e afins referem-se a uma coleção de células. Por exemplo, uma massa celular pode referir-se a um pélete de célula. Conforme aqui utilizado, "massa celular desejada" e afins referem-se a uma coleção de células, p. ex., um pélete de célula, que um praticante deseja obter numa cultura de células. Conforme aqui utilizado, "unidade de massa celular" e afins refletem uma quantidade de formas de representar massa celular, p. ex., número de células, densidade celular, volume de células, volume de células concentradas, peso seco das células, etc. Um perito na

técnica saberá qual é a forma mais conveniente ou apropriada de representar uma unidade de massa celular, etc., para uma determinada condição experimental. Um perito na técnica também compreenderá que, dependendo da unidade de massa celular, M , o multiplicador para massa celular desejada, isto é, as unidades máximas desejadas de massa celular, será representado por números de célula máximos desejados, densidade celular máxima desejada, volume de células máximo desejado, volume de células concentradas máximo desejado, peso seco máximo desejado, etc.

Numa forma de realização da divulgação, a unidade de massa celular é representada pela densidade celular, e a massa celular desejada é representada pela densidade celular máxima desejada. Noutra forma de realização, a unidade de massa celular é representada pela massa ou pelo peso seco das células. A massa celular desidratada consiste essencialmente em todas as proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos presentes nessa massa celular. Deste modo, a concentração, X , de um aminoácido pode ser determinada de forma experimental, fazendo girar primeiro um número conhecido de células para um pélete de célula, secando o pélete de célula e, subsequentemente, expondo o pélete seco a hidrólise ácida, provocando assim a lise das proteínas celulares do pélete de célula relativamente a aminoácidos individuais, que podem depois ser quantificados por um analisador de aminoácido (consulte, p. ex., o Exemplo 1). Isto fornece a concentração de aminoácido, X , de um determinado número de células, que pode depois ser convertido no requisito de aminoácido para a densidade celular máxima desejada utilizando M , o multiplicador para a densidade celular máxima desejada. Na Tabela 1, a concentração total de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para a densidade celular máxima desejada de 15×10^6 células/ml (coluna 5) é determinada multiplicando a concentração, X , do aminoácido necessário

para 10^6 células/ml (coluna 3) pelo multiplicador, M, em que $M=15$. Deste modo, em alguns exemplos representativos da divulgação, a unidade de massa celular é de 10^6 células/ml. Em alternativa, p. ex., para um aminoácido conhecido por ser suscetível a degradação, a concentração, X, do aminoácido que é utilizada na fórmula acima pode ser determinada a partir dos valores da literatura, p. ex., Nyberg et al. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62:324 a 35; Nadeau et al. (2000) *Metab. Eng.* 2:277 a 92; e Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299 a 318, ou dos métodos divulgados nessas publicações ou publicações semelhantes conhecidas na técnica.

Quando o multiplicador M para a massa celular desejada é representado pela densidade celular máxima desejada, M pode ser escolhido como, p. ex., a densidade máxima de uma determinada linha celular, pela densidade na qual a produtividade da linha celular é maximizada, ou pela densidade prevista para a linha celular num determinado período de tempo com base na taxa de crescimento específica.

A concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para a manutenção de células, Y, é uma percentagem da concentração de aminoácido necessária para a massa celular desejada, p. ex., densidade celular máxima desejada. Numa forma de realização da divulgação, o requisito de manutenção varia entre 0% e 300% do requisito de massa celular desejada, que fornece nutrientes suficientes para a utilização de células sem risco de toxicidade induzida por nutrientes. Noutra forma de realização da divulgação, o requisito de manutenção varia entre 0% e 150% do requisito de massa celular desejada, que fornece nutrientes suficientes para a utilização de células sem risco de toxicidade induzida por nutrientes. O requisito de manutenção aumenta à medida que a duração da cultura aumenta (p. ex., 100 a 150% de manutenção para uma

cultura de 21 dias). Na **Tabela 1**, a concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para a manutenção de células (coluna 6) é determinada multiplicando a concentração de aminoácido necessária para a densidade celular máxima desejada (coluna 5) pelo fator de manutenção de células, Y , que neste exemplo representativo corresponde a 100%, de modo a permitir um período de cultura alargado. O fator de manutenção, Y , será diferente para células diferentes (e linhas celulares diferentes) dependendo das exigências metabólicas exclusivas das células na cultura. Além disso, os requisitos de manutenção para células na cultura também serão diferentes devido à variabilidade nos processos, p. ex., densidade de inoculação, duração da cultura, tempo de mudança de temperatura, etc. Como uma diretriz inicial, é possível fornecer, p. ex., 0% de manutenção (diariamente) para culturas nos dias 0 a 5, 3% a 5% de manutenção (diariamente) para culturas nos dias 6 a 10, e 7% a 10% de manutenção (diariamente) para culturas nos dias 11 a 21. Para um processo superior a 21 dias, é possível fornecer às culturas 2% a 5% de manutenção (diariamente) para esses dias adicionais. Um perito na técnica irá perceber que o ajuste do fator de manutenção, Y , para otimizar a densidade e o título é meramente uma questão de método de tentativas habitual. O ajuste da concentração de aminoácido de acordo com o requisito de manutenção de células é importante para uma viabilidade e uma produtividade maiores da cultura de células e, deste modo, é um aspeto importante da presente divulgação. Por exemplo, o ajuste da concentração de aminoácido de acordo com o requisito de manutenção de células permite que a cultura de células mantenha uma densidade celular e uma viabilidade celular superiores, e produza um título de polipéptido mais elevado (consulte, p. ex., o Exemplo 6).

Depois de determinados os requisitos de aminoácido de: 1) massa celular (coluna 5); 2) manutenção de células (coluna 6); e 3) produção de polipéptidos para o título-alvo (coluna 4) desejadas, é possível obter a concentração total de aminoácido calculada da cultura de células-alvo. Na **Tabela 1**, a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células que é necessária para a cultura de células-alvo (coluna 7) é determinada adicionando a concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para o polipéptido de interesse num título de 10 g/L (coluna 4), a concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para a densidade celular máxima desejada de 15×10^6 células/ml (coluna 5), e a concentração de aminoácido do meio de cultura de células que é necessária para um nível selecionado de manutenção de células (coluna 6).

Depois de obtida a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células que é necessária para a cultura de células-alvo conforme descrito acima, o valor é ajustado para uma concentração de aminoácido do meio de cultura de células desejado, A, através de um fator de linha de base, F, que permite a força motriz da transferência de amino, p. ex., os aminoácidos adicionais necessários para a transferência de massa, os aminoácidos adicionais necessários para ativar o transporte pela membrana celular, etc. Este valor ajustado, A, é aqui referido como a "concentração de aminoácido de linha de base ajustada" ou "concentração otimizada". A concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, representa a quantidade total cumulativa de aminoácidos que serão fornecidos à cultura, expressada em relação ao volume final da cultura, que inclui o volume do meio inicial, mais o volume de quaisquer alimentações para culturas em perfusão ou *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo). O ajuste da concentração total de aminoácido para a concentração de

aminoácido de linha de base ajustada é um aspeto importante da divulgação, uma vez que permite uma viabilidade celular, uma densidade celular e títulos de polipéptido superiores (consulte, p. ex., o Exemplo 6).

O fator de linha de base, F , que aumenta a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células em, no máximo, 200%, varia entre 1 (0% de aumento) e 3 (200% de aumento). Numa forma de realização da divulgação, o intervalo para F é entre 1 e 1,5. Noutra forma de realização da divulgação, um valor de F abaixo de 1 pode ser compensado modificando a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células (Tabela 1, coluna 7), o que pode ser alcançado modificando a concentração de aminoácido necessária para a massa celular desejada, a concentração de aminoácido necessária para a manutenção de células, e/ou a concentração de aminoácido necessária para a incorporação no polipéptido de interesse. Por exemplo, um fator de linha de base de 0,5 pode ser compensado aumentando a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células em, p. ex., um fator de dois (ou mais), o que pode ser alcançado alterando M , X , N , P e/ou Y . Na Tabela 1, a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A , do meio de cultura de células que é necessária para o título-alvo e a densidade celular máxima desejada (coluna 8) é determinada multiplicando a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células (coluna 7) pelo fator de linha de base, F , que no exemplo representativo da Tabela 1 corresponde a 1,3 (correspondendo a um aumento de 30% sobre a concentração total de aminoácido calculada do meio de cultura de células).

O meio que contém a concentração de linha de base ajustada, A , de um aminoácido é aqui referido como o "meio de cultura de células desejado". Deste modo, o "meio de cultura de células desejado" representa um meio de objetivo

que contém a concentração de linha de base ajustada, A. Este meio compreende, pelo menos, uma concentração de aminoácido determinada pela fórmula acima. Preferencialmente, o meio de cultura de células desejado contém mais de uma concentração de aminoácido determinada pela fórmula acima. Mais preferencialmente, o meio de cultura de células desejado contém, pelo menos, doze concentrações de aminoácido ajustadas, p. ex., uma concentração ajustada de arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina, determinadas pela fórmula acima. Será compreendido por um perito na técnica que a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, no meio de cultura de células desejado pode ser alcançada através de diversos meios, incluindo, mas sem limitação, a adição individual dos aminoácidos, a adição de peptona ou outros hidrolisados de proteína, e/ou a adição de outro meio de cultura de células concentrado (p. ex., um meio de cultura de células de alimentação (ou mistura de meio, p. ex., um pó de meio)) a um meio de cultura de células inicial (ou mistura de meio de cultura de células inicial, p. ex., um pó de meio). Um perito na técnica irá compreender que a adição de peptona (ou outro hidrolisado de proteína) pode ser orientada pelos teores de aminoácido do produto de peptona específico de escolha, ou através da determinação da concentração de aminoácido fornecida por uma determinada peptona, p. ex., em geral, 5 g/L de peptona fornecem uma concentração de cerca de 40 mM a cerca de 50 mM de aminoácidos totais.

A concentração de aminoácido no meio de cultura de células desejado baseia-se, pelo menos, numa concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, determinada pela fórmula inventiva aqui divulgada; contudo, essa concentração, bem como outras concentrações de aminoácidos no meio de cultura de células desejado, pode variar das

concentrações de aminoácido de linha de base ajustada devido à influência de diversos fatores. Por exemplo, determinados aminoácidos podem ser produzidos durante a cultura, e podem assim ser mantidos num nível baixo. Outros aminoácidos podem variar com base nos valores publicados (consulte, p. ex., o Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568). Além disso, alguns aminoácidos, p. ex., metionina, podem ser consumidos a uma velocidade superior por tipos de célula específicos e, por conseguinte, devem ser adicionados em excesso. Contudo, outros aminoácidos, tais como prolina, fornecem uma força motriz para o crescimento celular e a produção de polipéptidos (consulte o Exemplo 4), e estes aminoácidos devem ser fornecidos, em alguns casos, numa quantidade superior à determinada pela fórmula inventiva acima. Além disso, é possível modificar a concentração de aminoácido de linha de base ajustada se a concentração obtida utilizando a fórmula acima for considerada como sendo tóxica (p. ex., a consideração dos níveis de serina, tirosina, metionina e valina). É do conhecimento de um perito na técnica, na obtenção da concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de aminoácidos para a utilização no meio de cultura de células desejado, a alteração da concentração de aminoácido de linha de base ajustada com base em fatores, tais como os aqui mencionados.

Os componentes de meios adicionais, por exemplo, vitaminas, sais, glicose, elementos, podem ser calculados a partir de (ou com base em) várias fontes, p. ex., Pedidos de Patente Publicados U.S. n.º 2005/0070013 e 2006/0121568. Além disso, a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de um aminoácido obtido utilizando a fórmula acima pode ser modificada para fornecer uma determinada relação relativamente a outro aminoácido (p. ex., a relação de glutamina para asparagina) ou para se inserir numa concentração combinada desejada (p. ex., a concentração

combinada de glutamina e asparagina). Por exemplo, é sabido que um meio com um elevado teor de asparagina e um baixo teor de glutamina combinado com uma mudança de temperatura permite a absorção de lactato, desintoxicando assim uma cultura de células (Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568). Deste modo, é possível modificar a concentração de linha de base ajustada, A, de glutamina e/ou asparagina, de modo a obter uma relação ideal.

Será verificado a partir do exemplo representativo na Tabela 1 que a concentração combinada de concentrações de aminoácido de linha de base ajustada para a utilização no meio de cultura de células desejado é elevada, isto é, mais de 243 mM. Deste modo, é aqui divulgada a descoberta de que é possível utilizar uma concentração elevada de aminoácidos num meio de cultura de células desejado sem toxicidade ou prejuízo do título se essa concentração se basear nos requisitos de aminoácido calculados para uma densidade celular-alvo e um título de polipéptido. Numa forma de realização da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura de células desejado corresponde a um valor entre cerca de 120 mM e cerca de 250 mM. Noutras formas de realização, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura de células desejado é superior a cerca de 250 mM, p. ex., 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 intermédio.

A concentração de linha de base ajustada identificada acima, A, de um aminoácido que é utilizado num meio de cultura de células desejado pode ser utilizada em culturas *batch* (sistema fechado), *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) e em perfusão. Quando utilizada na cultura *batch* (sistema fechado), a concentração inicial do aminoácido utilizada no meio de cultura de células desejado é a concentração de aminoácido de linha de base ajustada,

A. Quando utilizada em culturas *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) ou em perfusão, a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, representa a quantidade total cumulativa de aminoácidos que será fornecida à cultura, que inclui o volume do meio inicial mais o volume de todas as alimentações. Deste modo, para culturas *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo), que utilizam alimentações contínuas (p. ex., alimentações nos dias 3 a 21) ou alimentações periódicas (p. ex., alimentações a cada 2, 3 dias), o meio inicial é produzido para conter uma concentração inicial do aminoácido, B, de acordo com a fórmula $B = [A - (Z \cdot V)] / (1 - V)$, em que Z corresponde à concentração do aminoácido no meio de cultura de células de alimentação, e V corresponde ao volume do meio de cultura de alimentação como uma proporção do volume do meio de cultura de células desejado. Um exemplo representativo dos cálculos necessários para obter a concentração de aminoácido inicial, B, é fornecido na Tabela 2 abaixo. Na Tabela 2, algumas concentrações de aminoácido de linha de base ajustada, A (coluna 2), são convertidas na concentração de aminoácido de meios inicial, B (coluna 5), com base num volume de alimentação de 17% (V=17%), e na concentração de aminoácido de meio de alimentação, Z (coluna 4). Neste exemplo, diversas concentrações de aminoácido de linha de base ajustada, A (coluna 2), e concentrações de aminoácido iniciais, B (coluna 5), são modificadas para os valores ilustrados a negrito nas colunas 3 e 6. A modificação de concentrações de asparagina, ácido aspártico, glutamina e cisteína baseou-se nas concentrações sugeridas pelo Pedido de Patente Publicado U.S. n.º 2006/0121568; a metionina foi ajustada em 50% para compensar o respetivo consumo numa quantidade superior ao previsto; a alanina, o ácido glutâmico e a glicina são produzidos através das culturas (e mantidos assim num nível baixo); e as concentrações de

serina, tirosina e valina foram diminuídas para níveis não tóxicos. Por conseguinte, será compreendido que a concentração de aminoácido inicial, B, pode basear-se na concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, ou na concentração de aminoácido de linha de base ajustada modificada.

Um perito na técnica irá apreciar que o meio de alimentação utilizado para obter o meio de cultura de células desejado durante a cultura *fed-batch* (intermitente/contínuo) e em perfusão de células deve ser o mais concentrado possível de modo a evitar o transbordamento no recipiente no qual a cultura é realizada (p. ex., um biorreator ou frasco misturador) e para evitar a diluição dos componentes dos meios. No exemplo apresentado na Tabela 2, os meios de alimentação preferidos são indicados como "Meio de Alimentação", e as concentrações de aminoácido, Z, do Meio de Alimentação são apresentadas na coluna 4. Contudo, é possível utilizar qualquer meio de alimentação altamente concentrado, ou qualquer método de fornecimento de aminoácidos altamente concentrados ao meio de cultura de células inicial, desde que a concentração de aminoácido de linha de base ajustada desejada, A, seja alcançada no volume-alvo. Esses métodos de fornecimento de aminoácidos altamente concentrados a uma cultura de células são geralmente utilizados e bem conhecidos de um perito na técnica.

Será compreendido por um perito na técnica que a concentração inicial do aminoácido, B, no meio de cultura de células inicial pode ser alcançada através de diversos meios, incluindo, mas sem limitação, a adição individual dos aminoácidos, a adição de peptona e/ou outro hidrolisado de proteína, e/ou a adição de outro meio de cultura concentrado (ou mistura de meio, p. ex., um pó de meio) ao meio de cultura de células inicial (ou mistura de meio de cultura de células inicial, p. ex., um pó de meio). Será

igualmente compreendido por um perito na técnica que a concentração do aminoácido, Z, no meio de cultura de células de alimentação pode ser alcançada através de diversos meios, incluindo, mas sem limitação, a adição individual dos aminoácidos, a adição de peptona e/ou outro hidrolisado de proteína, e/ou a adição de outro meio de cultura concentrado (ou mistura de meio, p. ex., um pó de meio) ao meio de cultura de células de alimentação (ou mistura de meio de cultura de células de alimentação, p. ex., um pó de meio).

Será verificado a partir do exemplo representativo na Tabela 2 que a concentração combinada de aminoácidos para a utilização no meio de cultura de células inicial é elevada, isto é, mais de 125 mM. Deste modo, é aqui divulgada a descoberta de que é possível utilizar uma concentração elevada de aminoácidos sem toxicidade ou prejuízo do título num meio de cultura de células inicial se a concentração de aminoácido inicial se basear nos requisitos de aminoácido calculados para uma densidade celular máxima desejada e um título de polipéptido desejado. Numa forma de realização da invenção, a concentração combinada de aminoácidos corresponde a um valor entre cerca de 70 mM e cerca de 510 mM. Numa forma de realização da invenção, a concentração combinada de aminoácidos corresponde a um valor entre cerca de 120 mM e cerca de 350 mM. Noutra forma de realização da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura de células inicial corresponde a um valor entre cerca de 70 mM e cerca de 140 mM. Noutra forma de realização da invenção, a concentração combinada de aminoácidos no meio de cultura de células inicial é superior a cerca de 140 mM.

Tabela 2: Determinação Representativa da Concentração de Aminoácido Inicial para um Título-Alvo de 10 g/L de Anticorpo, uma Densidade Celular Máxima Desejada de 15×10^6 células/ml, e uma Alimentação de 17%

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Amino-ácido (AA)	Concentração de AA de Linha de Base Ajustada Necessária para Título-Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada	Modificação da Concentração de AA de Linha de Base Ajustada Necessária para Título-Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada	Concentração de AA do Meio de Alimentação	Concentração de AA Inicial para Título-Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada (V=17%)	Concentração de AA Inicial Modificada para Título-Alvo e Densidade Celular Máxima 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

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Amino- ácido (AA)	Concentração de AA de Linha de Base Ajustada Necessária para Título- Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada	Modificação da Concentração de AA de Linha de Base Ajustada Necessária para Título- Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada	Concentração de AA do Meio de Alimentação	Concentração de AA Inicial para Título- Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada (V=17%)	Concentração de AA Inicial Modificada para Título- Alvo e Densidade Celular Máxima Desejada
	mM	mM	mM	mM	mM
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 ilustrado na **Tabela 3A** e na **Tabela 3B**, a determinação da concentração de aminoácido de linha de base ajustada de um aminoácido, A, utilizada num meio de cultura de células desejado, e a determinação da concentração de aminoácido inicial, B, utilizada no meio de cultura de células inicial, podem ser calculadas para qualquer título de polipéptido-alvo desejado e densidade celular (alvo) máxima desejada. A densidade celular máxima desejada da cultura em grande escala varia entre cerca de 3 e cerca de 40×10^6 células/mL para a cultura *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo). Numa forma de realização da divulgação, a densidade celular máxima desejada varia entre cerca de 5 e cerca de 20×10^6 células/mL. O título-alvo da cultura em grande escala varia entre cerca de 3 e cerca de 25 g/L. Noutra forma de realização ainda da divulgação, o

título-alvo da cultura em grande escala varia entre cerca de 5 e cerca de 20 g/L. Por exemplo, na Tabela 3, a densidade celular máxima desejada varia entre 10 e 15 x 10⁶ células/mL, e o título-alvo varia entre 3 e 10 g/L.

Tabela 3A: Exemplos Representativos de Concentrações de Aminoácido de Linha de Base Ajustada, A, para Vários Títulos-Alvo (Conforme Representado por um Multiplicador para o Título de Polipéptido-Alvo, N) e Densidades Celulares Máximas Desejadas (Conforme Representado por um Multiplicador para a Densidade Celular Máxima Desejada, M).

A	N=10 M= 15	N=5 M=12,5	N=3 M=10
Concentração de Aminoácido	mM	mM	mM
ALA	17,2	12,5	9,50
ARG	8,5	6,3	4,81
ASN	9,2	6,5	4,89
ASP	15,1	11,3	8,68
CYS	6,1	4,3	3,20
GLU	11,3	7,7	5,60
GLN	16,5	12,1	9,14
GLY	16,0	11,3	8,43
HIS	4,8	3,3	2,46
ILE	7,9	6,0	4,60
LEU	16,2	11,4	8,50
LYS	16,0	11,1	8,18
MET	3,5	2,5	1,87
PHE	7,7	5,4	3,99
PRO	13,8	8,9	6,36
SER	25,9	17,4	12,66
THR	16,8	11,0	7,93
TRP	3,6	2,3	1,61
TYR	9,1	6,1	4,43
VAL	18,7	12,4	8,94

A	N=10 M= 15	N=5 M=12,5	N=3 M=10
Concentração de Aminoácido	mM	mM	mM
Total	243,8	169,8	125,8

Tabela 3B: Exemplos Representativos de Concentrações de Aminoácido de Meios Iniciais, B, para Vários Títulos-Alvo (Conforme Representado por um Multiplicador para o Título de Polipéptido-Alvo, N) e Densidades Celulares Máximas Desejadas (Conforme Representado por um Multiplicador para a Densidade Celular Máxima Desejada, M); As Concentrações de Aminoácido de Meios Iniciais Foram Determinadas Subtraindo a Alimentação e Outras Modificações das Concentrações de Aminoácido de Linha de Base Ajustada

B	N=10 M=15	N=5 M=12,5	N=3 M=10
Concentração de Aminoácido	mM	mM	mM
ALA	0,2	0,2	0,20
ARG	3,0	1,9	1,68
ASN	17,4	14,6	10,77
ASP	1,7	1,7	1,70
CYS	0,4	0,4	0,40
GLU	0,2	0,2	0,20
GLN	4,0	4,0	4,00
GLY	3,5	3,6	3,75
HIS	3,5	2,2	1,56
ILE	3,6	2,5	2,10
LEU	11,1	6,9	5,09
LYS	12,7	7,9	5,73
MET	3,7	2,4	1,78
PHE	5,9	3,8	2,75
PRO	12,7	7,4	5,04
SER	10,2	10,2	9,00
THR	14,9	8,8	6,10

B	N=10 M=15	N=5 M=12,5	N=3 M=10
Concentração de Aminoácido	mM	mM	mM
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

Mediante a utilização da fórmula para determinar concentrações de aminoácido de linha de base ajustada e para desenvolver formulações de meios de cultura de células desejadas para a produção de polipéptidos em grande escala, os inventores identificaram diversos critérios que resultam num título elevado e em culturas de densidade celular elevada. Os critérios para a produção de um título superior a 5 g/L, que são representados pelos valores ilustrados na Tabela 4, incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: igual ou superior 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 com um valor entre cerca de 35 mM e cerca de 150 mM; uma concentração combinada de leucina, lisina, treonina e valina com um valor entre cerca de 60% e cerca de 80% dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura de células desejado; uma concentração combinada dos aminoácidos essenciais no meio de cultura de células desejado com um valor entre cerca de 30% e cerca de 50% dos aminoácidos totais no meio de cultura de células desejado; e/ou uma concentração combinada de aminoácidos totais com um valor entre cerca de 75 mM e cerca de 510 mM.

Tabela 4: Exemplos Representativos das Relações e do Teor de Aminoácido para Meios Concebidos Racionalmente para Vários Títulos-Alvo e Densidades Celulares Máximas Desejadas (conforme indicado acima, a unidade básica de título de polipéptido é de 1 g/L, e a unidade básica de massa celular é de 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 Total	75,37	195,97	246,11	341,81	509,28
Essencial Total	32,22	83,78	105,84	145,49	214,87
Negrito Total	21,39	55,61	71,37	95,46	137,61

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)
Negrito/Essencial	66%	66%	67%	66%	64%
Negrito/Total	28%	28%	29%	28%	27%
Essencial/Total	43%	43%	43%	43%	42%

Na **Tabela 4**, os aminoácidos a negrito correspondem a valina, treonina, leucina e lisina, os aminoácidos em itálico correspondem aos aminoácidos essenciais (p. ex., arginina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, triptofano, treonina e valina; e para culturas de células CHO, a prolina é adicionalmente um aminoácido essencial; um perito na técnica tem conhecimento das alterações na definição de aminoácidos essenciais, uma vez que se aplica a células diferentes, etc.). A **Tabela 4** fornece meios de cultura de células desejados representativos para células CHO numa variedade de densidades celulares-alvo (M), títulos-alvo (N), requisitos de manutenção de células (Y) e ajustes de linha de base (F).

Um perito na técnica reconhecerá que os meios concebidos racionalmente da divulgação podem ser utilizados para produzir um polipéptido de interesse, ou podem ser utilizados na cultura de células que não é concebida para a produção de polipéptidos. Em conformidade, os meios concebidos racionalmente podem ser utilizados nos métodos divulgados de cultura de células, p. ex., para o crescimento, a replicação e/ou a manutenção eficientes de culturas de células, p. ex., culturas de células em grande escala, que não contêm células hospedeiras criadas para produzir um polipéptido exógeno de interesse, ou que não são cultivadas para produzir um polipéptido endógeno de

interesse. Numa circunstância dessas, o meio de cultura de células desejado não necessita de justificar os aminoácidos necessários para a incorporação no polipéptido de interesse, e em vez disso contém concentrações de aminoácido com base na concentração dos aminoácidos necessários para: 1) massa celular desejada, e 2) manutenção de células. Um meio de cultura de células desejado desses utilizado nos métodos divulgados de cultura de células contém uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A' , de acordo com a fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, em que X corresponde a uma concentração do aminoácido que é utilizada por unidade de massa celular, M é um multiplicador para uma massa celular máxima desejada (p. ex. densidade celular máxima desejada, etc.) da cultura de células, Y corresponde a um fator de manutenção de células, e F corresponde a um fator de linha de base. Um meio de cultura de células desejado produzido de acordo com esta fórmula é então fornecido a uma cultura de células em condições que permitem o crescimento e a replicação das células na cultura de células. Numa forma de realização da invenção, o método de cultura de células utiliza uma cultura de células em grande escala. Noutra forma de realização da invenção, o método de cultura de células utiliza células animais.

Adição de Prolina aos Meios de Cultura de Células

Mediante a utilização de métodos de conceção racional de meios aqui divulgados, foi determinado que a manutenção de níveis elevados de prolina durante todo o período de tempo da cultura de células, p. ex., cultura de células em grande escala, resulta num título de polipéptido e numa densidade celular maiores. Este "limiar" de prolina varia entre cerca de 1 mM e cerca de 2 mM, e um nível de prolina na cultura de células mantido acima deste limiar parece ser uma força motriz para a produção de culturas de células em grande escala de densidade celular elevada e título

elevado. Curiosamente, o título de polipéptido aumentado ativado por prolina e a viabilidade celular aumentam simultaneamente o requisito da cultura relativamente a aminoácidos adicionais (de modo a satisfazer a taxa de consumo aumentada), o que explica, pelo menos parcialmente, a razão por que as presentes formulações de meios concebidos racionalmente contêm elevadas concentrações de aminoácidos.

Fornecimento de uma Cultura de Células

Vários métodos de preparação de células de mamífero para a produção de polipéptidos através de cultura *batch* (sistema fechado) e *fed-batch* (sistema intermitente/contínuo) são bem conhecidos na técnica. Conforme descrito acima, um ácido nucleico suficiente para alcançar a expressão (tipicamente um vetor que contém o ácido nucleico que codifica o polipéptido de interesse e quaisquer elementos de controlo genético ligados de modo funcional) pode ser introduzido na linha de célula hospedeira através de diversas técnicas bem conhecidas. Habitualmente, as células são examinadas para determinar qual das células hospedeiras absorveu realmente o vetor e expressar o polipéptido ou a proteína de interesse. Os métodos tradicionais de deteção de um determinado polipéptido ou proteína de interesse expressado através de células de mamífero incluem, mas não se limitam a, imunohistoquímica, imunoprecipitação, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, SDS-PAGE, *Western blots*, ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), ensaios de atividade biológica e cromatografia de afinidade. Um perito na técnica terá conhecimento de outras técnicas apropriadas para detetar proteínas ou polipéptidos expressados. Se múltiplas células hospedeiras expressarem o polipéptido ou a proteína de interesse, algumas ou a totalidade das técnicas indicadas podem ser utilizadas para determinar que

células expressam esse polipéptido ou essa proteína nos níveis mais elevados.

Depois de identificada uma célula que expressa o polipéptido ou a proteína de interesse, a célula propaga-se na cultura através de qualquer um dos diversos métodos bem conhecidos de um perito na técnica. A célula que expressa o polipéptido ou a proteína de interesse é habitualmente propagada ao crescer a uma temperatura e num meio que sejam favoráveis para a sobrevivência, o crescimento e a viabilidade da célula. A cultura inicial pode ter qualquer volume, mas tem muitas vezes um volume inferior ao volume de cultura do biorreator de produção utilizado na produção final do polipéptido ou proteína de interesse, e as células passam frequentemente diversas vezes nos biorreatores de aumento de volume antes da semeadura no biorreator de produção. A cultura de células pode ser agitada ou misturada para aumentar a oxigenação do meio e a dispersão de nutrientes para as células. Em alternativa ou além disso, é possível utilizar dispositivos económicos especiais que são bem conhecidos na técnica para aumentar e controlar a oxigenação da cultura. De acordo com a presente invenção, um perito na técnica compreenderá que pode ser benéfico controlar ou regular determinadas condições internas de uma cultura de células, incluindo, mas sem limitação, o pH (p. ex., 6,6 a 7,6), a temperatura (p. ex., 25 °C a 42 °C), os níveis de oxigénio e dióxido de carbono (p. ex., O₂: 10% a 80% e CO₂: 7% a 15% em toda a cultura), e a osmolalidade (p. ex., uma osmolalidade inicial de 260 a 340 mOsm/kg), etc.

Conforme aqui utilizado, o termo "inóculo" é utilizado para se referir a um volume de células que contêm o ácido nucleico que expressa o polipéptido de interesse, que é utilizado para semear o recipiente de produção no qual irá ocorrer a cultura animal em grande escala, p. ex., o biorreator de produção. Numa forma de realização da

invenção, o volume de inóculos é de cerca de 60 a 80% do volume final.

A densidade celular inicial no biorreator de produção pode ser escolhida por um perito na técnica. De acordo com a presente invenção, a densidade celular inicial no biorreator de produção pode ser tão baixa como uma única célula por volume de cultura. Nas formas de realização preferidas da presente invenção, as densidades celulares iniciais no biorreator de produção podem variar entre cerca de $0,1 \times 10^6$ células viáveis por mL e cerca de 10×10^6 células viáveis por mL e mais.

As culturas de células iniciais e intermédias podem crescer até qualquer densidade desejada antes de semear o próximo biorreator de produção intermédio ou final. Numa forma de realização da invenção, a densidade celular de inóculos é de cerca de $0,5$ a 1×10^6 células/mL. É preferido que a maioria das células permaneçam vivas antes da sementeira, embora não seja necessária uma viabilidade total ou quase total. Numa forma de realização da presente invenção, as células podem ser removidas do sobrenadante, por exemplo, mediante centrifugação a baixa velocidade. Igualmente, pode ser desejável lavar as células removidas com um meio antes de semear o próximo biorreator para remover quaisquer produtos de resíduos metabólicos indesejados ou componentes do meio. O meio pode ser o meio no qual as células cresceram anteriormente ou pode ser um meio diferente ou uma solução de lavagem selecionada pelo praticante da presente invenção.

As células podem então ser diluídas até uma densidade apropriada para a sementeira no biorreator de produção. As células podem ser diluídas noutro meio ou noutra solução, p. ex., o meio de cultura de células inicial ou o meio de cultura de células desejado, dependendo das necessidades e dos desejos do praticante da presente invenção, ou para acomodar determinados requisitos das próprias células (p.

ex., se as células tiverem de ser armazenadas durante um curto período de tempo antes da semeadura no biorreator de produção).

Fase de Crescimento Inicial

Depois de semear no recipiente de produção conforme descrito acima, a cultura de células animais pode ser mantida na fase de crescimento inicial utilizando o meio de cultura de células desejado obtido pela fórmula inventiva aqui divulgada, e em condições favoráveis para a sobrevivência, o crescimento e a viabilidade da cultura de células. As condições precisas irão variar dependendo do tipo de célula, do organismo a partir do qual a célula foi obtida e da natureza e do caráter da proteína ou do polipéptido expressado.

Um biorreator de produção pode ter qualquer volume que seja apropriado para a produção em grande escala de polipéptidos ou proteínas. Numa forma de realização preferida, o volume do biorreator de produção corresponde, pelo menos, a 500 litros. Noutras formas de realização preferidas, o volume do biorreator de produção é de 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros ou mais, ou qualquer volume intermédio. Um perito na técnica terá conhecimento de, e poderá escolher, um biorreator adequado para a utilização na aplicação da presente invenção. O biorreator de produção pode ser construído com qualquer material que seja favorável para a viabilidade e o crescimento das células que não interfira com a expressão ou a estabilidade da proteína ou do polipéptido expressado.

A temperatura da cultura de células na fase de crescimento inicial será selecionada essencialmente com base no intervalo de temperaturas no qual a cultura de células permanece viável. Por exemplo, durante a fase de crescimento inicial, as células CHO têm um bom desenvolvimento a 37 °C. Em geral, a maioria das células de mamífero desenvolvem-se bem a uma temperatura que varia

entre cerca de 35 °C e 39 °C. Numa forma de realização 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 31 °C. Os peritos na técnica serão capazes de seleccionar a temperatura ou as temperaturas apropriadas para o crescimento das células, dependendo das necessidades das células e dos requisitos de produção do praticante.

Numa forma de realização da presente invenção, a temperatura da fase de crescimento inicial é mantida numa única temperatura constante. Noutra forma de realização, a temperatura da fase de crescimento inicial é mantida num intervalo de temperaturas. Por exemplo, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída de forma contínua durante a fase de crescimento inicial. Em alternativa, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída em quantidades discretas várias vezes durante a fase de crescimento inicial. Um perito na técnica poderá determinar se devem ser utilizadas uma única ou múltiplas temperaturas, e se a temperatura deve ser ajustada de forma contínua ou em quantidades discretas.

As células podem crescer durante a fase de crescimento inicial durante um período de tempo maior ou menor, dependendo das necessidades do praticante e do requisito das próprias células. Numa forma de realização, as células crescem durante um período de tempo suficiente para alcançar uma densidade de células viáveis que corresponda a uma determinada percentagem da densidade de células viáveis máxima que será eventualmente alcançada pelas células se as mesmas puderem crescer sem perturbações. Por exemplo, as células podem crescer durante um período de tempo suficiente para alcançar uma densidade de células viáveis 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 de densidade de células viáveis máxima.

Noutra forma de realização, as células podem crescer durante um período de tempo definido. Por exemplo, dependendo da concentração inicial da cultura de células, da temperatura na qual as células crescem e da taxa de crescimento intrínseco das células, as células podem crescer 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, as células podem crescer durante um mês ou mais. As células iriam crescer durante 0 dias no biorreator de produção se o respetivo crescimento num biorreator de sementes, na temperatura de fase de crescimento inicial, fosse suficiente para que a densidade de células viáveis no biorreator de produção no momento da respetiva inoculação já se encontrasse na percentagem desejada da densidade de células viáveis máxima. O praticante da presente invenção poderá escolher a duração da fase de crescimento inicial dependendo dos requisitos de produção de polipéptidos ou proteínas e das necessidades das próprias células.

A cultura de células pode ser agitada ou misturada durante a fase de cultura inicial de modo a aumentar a oxigenação e a dispersão de nutrientes para as células. De acordo com a presente invenção, um perito na técnica compreenderá que pode ser benéfico controlar ou regular determinadas condições internas do biorreator durante a fase de crescimento inicial, incluindo, mas sem limitação, o pH, a temperatura, a oxigenação, etc. Por exemplo, o pH pode ser controlado fornecendo uma quantidade apropriada de ácido ou base, e a oxigenação pode ser controlada com dispositivos económicos que são bem conhecidos na técnica.

Mudança de Condições de Cultura

No fim da fase de crescimento inicial, as condições de uma cultura podem ser mudadas para que um segundo conjunto de condições de cultura seja aplicado e ocorra uma mudança metabólica na cultura. A acumulação de metabolitos inibidores, mais especialmente lactato e amónia, inibe o

crescimento. Uma mudança metabólica realizada, p. ex., por uma alteração na temperatura, no pH, na osmolalidade ou no nível indutivo químico da cultura de células, pode ser caracterizada, p. ex., por uma redução na relação de uma taxa de produção de lactato específica com uma taxa de consumo de glicose específica. Numa forma de realização não limitativa, as condições de cultura são mudadas alterando a temperatura da cultura. Noutra forma de realização da invenção, a mudança de temperatura ocorre nos dias 1 a 7. Noutra forma de realização da invenção, a temperatura é mudada para um valor de 29 °C a 32 °C. Noutra forma de realização da invenção, a mudança de temperatura ocorre no dia 3, e a temperatura é mudada para 31 °C. Os ensinamentos relativamente à mudança de temperatura e à mudança metabólica podem ser encontrados na técnica (consulte, p. ex., o Pedido de Patente Publicado U.S. n.º US 2006/0121568).

Fase de Produção Subsequente

Depois de mudadas as condições da cultura de células conforme descrito acima, a cultura de células pode ser mantida para uma fase de produção subsequente num segundo conjunto de condições de cultura favoráveis para a sobrevivência e viabilidade da cultura de células e apropriadas para a expressão da proteína ou do polipéptido desejado em níveis adequados, p. ex., adequados comercialmente.

Conforme descrito acima, a cultura pode ser mudada mudando uma ou mais das diversas condições de cultura incluindo, mas não se limitando a, temperatura, pH, osmolalidade e níveis de butirato de sódio. Numa forma de realização, a temperatura da cultura é mudada. De acordo com esta forma de realização, durante a fase de produção subsequente, a cultura é mantida a uma temperatura ou num intervalo de temperaturas inferior à temperatura ou ao intervalo de temperatura da fase de crescimento inicial.

Por exemplo, durante a fase de produção subsequente, as células CHO expressam polipéptidos e proteínas recombinantes justamente num intervalo de 25 °C a 35 °C. Numa forma de realização da invenção, a fase de produção começa após o dia 3. Noutra forma de realização da invenção, a fase de produção é realizada a 31 °C. Conforme descrito no Pedido de Patente Publicado U.S. n.º US 2006/0121568, podem ser utilizadas múltiplas mudanças de temperatura discretas para aumentar a viabilidade ou a densidade celular ou para aumentar a expressão da proteína ou do polipéptido recombinante.

De acordo com a fórmula da presente invenção, uma massa celular desejada (p. ex., densidade celular) e um título de produção (p. ex., título-alvo) são selecionados de modo a estabelecer a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, e a concentração de aminoácido inicial, B. Deste modo, as células são geralmente mantidas na fase de produção subsequente até ser atingida a densidade celular desejada ou o título de produção, ou valores próximos da densidade celular desejada ou do título de produção. Numa forma de realização, as células são mantidas na fase de produção subsequente até o título da proteína ou polipéptido recombinante atingir um máximo. Noutras formas de realização, a cultura pode ser colhida antes deste momento, dependendo do requisito de produção do praticante ou das necessidades ou da viabilidade das próprias células. Por exemplo, as células podem ser mantidas durante um período de tempo suficiente para alcançar uma densidade de células viáveis 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 de densidade de células viáveis máxima. Em alguns casos, pode ser desejável permitir que a densidade de células viáveis atinja um máximo e, em seguida, permitir que a densidade de células viáveis diminua até um determinado nível antes da colheita da

cultura. Num exemplo extremo, pode ser desejável permitir que a densidade de células viáveis se aproxime de, ou atinja, zero antes da colheita da cultura.

Noutra forma de realização da presente invenção, as células podem crescer durante um período definido de tempo durante a fase de produção subsequente. Por exemplo, dependendo da concentração da cultura de células no início da fase de crescimento subsequente, da temperatura na qual as células crescem e da taxa de crescimento intrínseco das células, as células podem crescer 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, as células podem crescer durante um mês ou mais. O praticante da presente invenção poderá escolher a duração da fase de produção subsequente dependendo dos requisitos de produção de polipéptidos ou proteínas e das necessidades das próprias células. A duração da cultura irá ajudar a determinar a concentração de aminoácido necessária para a manutenção de células, que pode variar na presente invenção de, p. ex., 0% para 150% da concentração de aminoácido necessária para a massa celular.

Em determinados casos, pode ser benéfico ou necessário acrescentar suplementos à cultura de células, isto é, alimentar a cultura de células, durante a fase de produção subsequente com nutrientes ou outros componentes de meio que foram reduzidos ou metabolizados pelas células. Por exemplo, poderá ser vantajoso completar a cultura de células com nutrientes ou outros componentes de meio que foram reduzidos durante a monitorização da cultura de células (consulte a secção "Monitorização das Condições de Cultura de Células", abaixo). Em alternativa ou além disso, pode ser benéfico ou necessário acrescentar suplementos à cultura de células antes da fase de produção subsequente. Como exemplos não limitativos, pode ser benéfico ou necessário completar a cultura de células com hormonas e/ou

outros fatores de crescimento, iões específicos (tais como sódio, cloreto, cálcio, magnésio e fosfato), tampões, vitaminas, nucleósidos ou nucleótidos, oligoelementos (compostos inorgânicos habitualmente presentes em concentrações finais muito baixas), lípidos, aminoácido ou glicose (ou outra fonte de energia).

Todos estes componentes suplementares podem ser adicionados, isto é, fornecidos, à cultura de células numa determinada altura, ou podem ser fornecidos à cultura de células numa série de adições. Numa forma de realização da presente invenção, os componentes suplementares são fornecidos à cultura de células múltiplas vezes em quantidades proporcionais. Noutra forma de realização, pode ser desejável fornecer apenas determinados componentes suplementares numa fase inicial, e fornecer os restantes componentes posteriormente. Noutra forma de realização ainda da presente invenção, a cultura de células é alimentada continuamente com estes componentes suplementares.

De acordo com a presente invenção, o volume total adicionado à cultura de células deve ser idealmente mantido numa quantidade mínima. Por exemplo, o volume total do meio de alimentação, ou a solução que contém os componentes suplementares, adicionado à cultura de células pode corresponder a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50% do volume da cultura de células antes do fornecimento dos componentes suplementares. Deste modo, o meio de alimentação deve ser concentrado de modo a evitar o transbordamento do biorreator ou a diluição de componentes do meio. O meio de alimentação é preferencialmente fornecido à cultura principal com o mesmo pH, a mesma temperatura, etc., mas com concentrações elevadas de nutrientes em relação ao meio inicial. Numa forma de realização da invenção, o meio de alimentação é o

meio de alimentação designado por "Meio de Alimentação" na coluna 4 da Tabela 2.

Numa forma de realização da divulgação, uma cultura de células com uma concentração de aminoácido inicial, B, é completada com aminoácidos adicionais de modo a alcançar uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A. Noutra forma de realização da invenção, a cultura de células recebe uma alimentação contínua, aproximadamente, entre os dias 3 e 21, ou alimentações periódicas a cada 2, 3 dias. Noutra forma de realização da invenção, a alimentação ocorre aproximadamente entre o dia 3 e o dia 20 (para uma cultura de 21 dias) como alimentações em bolo. Noutra forma de realização da invenção, a alimentação ocorre como alimentações periódicas aproximadamente a cada 2, 3 dias. Noutra forma de realização ainda da invenção, o volume de alimentação é de cerca de 1% a cerca de 40% do volume total de cultura de células.

A cultura de células pode ser agitada ou misturada durante a fase de produção subsequente de modo a aumentar a oxigenação e a dispersão de nutrientes para as células. De acordo com a presente invenção, um perito na técnica compreenderá que pode ser benéfico controlar ou regular determinadas condições internas do biorreator durante a fase de crescimento subsequente, incluindo, mas sem limitação, o pH, a temperatura, a oxigenação, etc. Por exemplo, o pH pode ser controlado fornecendo uma quantidade apropriada de ácido ou base, e a oxigenação pode ser controlada com dispositivos económicos que são bem conhecidos na técnica.

Monitorização das Condições de Cultura de Células

Em determinadas formas de realização da presente invenção, o praticante pode considerar benéfica ou necessária a monitorização periódica de determinadas condições da cultura de células em crescimento. A monitorização das condições de cultura de células permite

ao praticante determinar se a cultura de células está a produzir ou não o polipéptido recombinante de interesse em níveis subótimos ou se a cultura está prestes a entrar ou não numa fase de produção subótima. Para monitorizar determinadas condições da cultura de células, pode ser necessário remover pequenas alíquotas da cultura para análise. Um perito na técnica compreenderá que essa remoção pode potencialmente contaminar a cultura de células, e tomará os cuidados apropriados para minimizar o risco dessa contaminação.

Como exemplos não limitativos, pode ser benéfico ou necessário monitorizar a temperatura, o pH, a densidade celular, a viabilidade celular, a densidade de células viáveis integradas, os níveis de lactato, os níveis de amónio, a osmolaridade ou o título do polipéptido expressado. Existem diversas técnicas bem conhecidas que permitirão a um perito na técnica avaliar estas condições. Por exemplo, a densidade celular pode ser medida utilizando um hemacitómetro, um contador Coulter, ou exame de densidade celular (CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). A densidade de células viáveis pode ser determinada através da coloração de uma amostra de cultura com azul de tripano. Uma vez que apenas as células mortas absorvem o azul de tripano (isto é, as células viáveis excluem o corante), a densidade de células viáveis pode ser determinada contando o número total de células, dividindo o número de células que absorvem o corante pelo número total de células e obtendo a relação recíproca. A HPLC pode ser utilizada para determinar os níveis de lactato, amónio ou a proteína ou o polipéptido expressado. Em alternativa, o nível da proteína ou do polipéptido expressado pode ser determinado através de técnicas de biologia molecular padrão, tais como coloração Coomassie de geles SDS-PAGE, *Western blotting*, ensaios de Bradford, ensaios de Lowry, ensaios de biureto e absorvância UV. Igualmente, pode ser benéfico ou necessário

monitorizar as modificações pós-tradução da proteína ou do polipéptido expressado, incluindo a fosforilação e glicosilação.

Colheita de Polipéptidos Produzidos pela Cultura de Células

O polipéptido de interesse que é produzido pela cultura de células pode então ser purificado a partir do meio de cultura ou a partir de extratos de célula para a utilização em várias aplicações. As formas solúveis do polipéptido podem ser purificadas a partir de meios condicionados. As formas ligadas à membrana do polipéptido podem ser purificadas preparando uma fração de membrana total a partir da célula de expressão e extraíndo as membranas com um detergente não iónico, tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). As proteínas citosólicas ou nucleares podem ser preparadas mediante lise das células hospedeiras (através de força mecânica, bomba Parr, aplicação de ultrassons (sonicação), detergente, etc.), remoção da fração de membrana celular por centrifugação e retenção do sobrenadante.

O polipéptido pode ser purificado utilizando outros métodos conhecidos dos peritos na técnica. Por exemplo, um polipéptido produzido através dos métodos divulgados pode ser concentrado utilizando um filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração AMICON® ou PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). A seguir à etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado numa matriz de purificação, tal como um meio de filtração de gel. Em alternativa, pode ser utilizada uma resina de troca aniónica (p. ex., uma coluna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); essa resina contém uma matriz ou um substrato com grupos dietilaminoetilo (DEAE) ou polietilenimina (PEI) pendentos. As matrizes utilizadas para purificação podem ser acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos geralmente utilizados na purificação de proteínas. Em

alternativa, uma etapa de troca catiónica pode ser utilizada para a purificação de proteínas. Os permutadores catiónicos adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfopropilo ou carboximetilo (p. ex., colunas S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

A purificação do polipéptido a partir do sobrenadante de cultura também pode incluir uma ou mais etapas de coluna sobre resinas de afinidade, tais como concanavalina A-agarose, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® ou azul de Cibacron 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); colunas de cromatografia de interação hidrofóbica utilizando essas resinas como éter fenílico, éter butílico ou éter propílico; ou colunas de imunoafinidade utilizando anticorpos para a proteína rotulada. Finalmente, é possível utilizar uma ou mais etapas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizando meios HPLC hidrofóbicos, p. ex., gel de sílica com grupos metilo ou outros alifáticos pendentes (p. ex., colunas Ni-NTA), para purificar mais a proteína. Em alternativa, os polipéptidos podem ser expressados de modo recombinante numa forma que facilita a purificação. Por exemplo, os polipéptidos podem ser expressados como uma fusão com proteínas, tais como proteína de ligação à maltose (MBP), glutathione-S-transferase (GST) ou tioredoxina (TRX). Os *kits* para a expressão e purificação de proteínas de fusão estão disponíveis comercialmente a partir de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen (Carlsbad, CA), respetivamente. As proteínas também podem ser etiquetadas com um pequeno epítipo (p. ex., etiquetas His, myc ou Flag) e subsequentemente identificadas ou purificadas utilizando um anticorpo específico para o epítipo escolhido. Os anticorpos para epítipos comuns estão disponíveis a partir de diversas fontes comerciais.

Como uma alternativa aos modos de purificação de cromatografia tradicionais (p. ex., modos de purificação de

cromatografia de passagem e de ligação-eluição), os polipéptidos produzidos através dos métodos da presente invenção podem ser purificados utilizando uma coluna de purificação de cromatografia num modo de partição fraca, uma técnica na qual, pelo menos, um produto contido na preparação e, pelo menos, uma substância contaminadora ou impureza se ligam a um meio ou resina cromatográfica. No modo de partição fraca, a, pelo menos uma, impureza liga-se mais firmemente ao meio do que o produto de polipéptido; e à medida que o carregamento (do fluido de carga) continua, o produto de polipéptido não ligado passa seletivamente pelo meio e é recuperado a partir do efluente de coluna. Essa purificação resulta num elevado grau de redução de impureza, bem como numa elevada recuperação de produto. Essa purificação pode ser alcançada nas resinas e nos meios conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, meio de troca iónica carregado, resina de cromatografia de interação hidrofóbica, resina de cromatografia de afinidade de metal imobilizado e resina de hidroxiapatite. Pelo menos numa forma de realização, a remoção de impurezas/substâncias contaminadoras em condições de partição fraca ocorre à medida que o fluido de carga passa por um meio/uma resina que liga, pelo menos, 2,8 mg de produto por ml de meio/resina. Pelo menos numa outra forma de realização, a remoção de impurezas/substâncias contaminadoras em condições de partição fraca ocorre à medida que o fluido de carga passa por um meio/uma resina em condições de funcionamento definidas por um coeficiente de partição de, pelo menos, 0,1. O produto purificado é recuperado a partir do efluente da coluna que contém o meio/a resina.

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

Tabela 5: Características dos Modos FT/WP/B-E			
	FT	WP	B-E
Kp	< 0,1	0,1 a 20	>20
Limitação de desafio de carga	Impurezas de 10 a 50 mg de Prod/mL (típico), mas na realidade dependente da pureza de carga	Impurezas de 50 a 500 mg de Prod/mL (típico), mas na realidade dependente da pureza de carga	Produto + impurezas < 100 mg de Prod/mL
Vol. de Carga	Moderado, para impurezas diluídas de 10 a 20 VCs	Muito alto, para impurezas diluídas até 50 VCs	Mais baixo, uma vez que o produto se liga além das impurezas de 5 a 20 VCs
[Produto] em eluato de carga	Igual à concentração de carga através de muita carga	Atraso inicial, depois igual à concentração de carga através de muita carga	<5% de concentração de carga
[Impureza] Residual	Baixa	Muito baixa	Dependente das condições de eluição, capacidade e volume de <i>pool</i>
Produto ligado (Q)	< 1 mg/mL	< 10 a 20 mg/mL	> 10 a 20 mg/mL
Região de funcionamento	Gama relativamente vasta de condições	Janela modesta de funcionamento entre os modos FT e B-E	Condições rigorosas de ligação para carga, vasta gama de condições de eluição
Fases móveis	Isocráticas	Isocráticas	Alteração na composição do tampão após carga que causa eluição

O coeficiente de partição (K_p) corresponde à relação da concentração do produto adsorvido (Q) com a concentração do produto na solução (C); deste modo, o K_p para o modo de partição fraca é intermédio entre o K_p para os modos de passagem e de ligação-eluição, p. ex., entre cerca de 0,1 e 20. Para determinar as condições apropriadas, p. ex., sal, tampão, pH, etc., para um modo de partição fraca de purificação, é possível efetuar um estudo de rastreio de purificação em lotes (*batch*) ou um rastreio de alto rendimento. Deste modo, um perito na técnica pode determinar coeficientes de partição de produto K_p como uma função de condições de funcionamento (consulte o Exemplo 7.1).

Os métodos de purificação que utilizam um modo de partição fraca são descritos em detalhe nos Pedidos de Patente U.S. n.º 11/372.054 e 11/510.634.

Algumas ou a totalidade das etapas de purificação anteriores em várias combinações ou com outros métodos conhecidos podem ser utilizadas para purificar um polipéptido de interesse produzido através dos meios e métodos de cultura de células animais em grande escala aqui descritos.

Composições Farmacêuticas que Contêm Polipéptidos Produzidos pela Cultura de Células

Os meios de cultura de células anteriores, p. ex., meios de cultura de células em grande escala, e os métodos de cultura de células fornecem polipéptidos de interesse, p. ex., anticorpos, recetores solúveis, proteínas de fusão, etc. Os polipéptidos produzidos através dos métodos de cultura de células divulgados, e com os novos meios e métodos relacionados aqui divulgados, incluindo anticorpos e fragmentos dos mesmos, podem ser utilizados *in vitro*, *ex vivo* ou incorporados em composições farmacêuticas e administrados em indivíduos (p. ex., sujeitos humanos) que necessitem dos mesmos. Diversas abordagens farmacogenómicas

a considerar na determinação sobre se deve ser ou não administrado um polipéptido da invenção são bem conhecidas de um perito na técnica e incluem associação ao nível de genomas, abordagem de genes candidatos e formação de perfis de expressão de genes. Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a respetiva via de administração pretendida (p. ex., as composições orais incluem geralmente um diluente inerte ou um portador comestível). Outros exemplos não limitativos de vias de administração incluem administração parentérica (p. ex., intravenosa), intradérmica, subcutânea, oral (p. ex., inalação), transdérmica (tópica), transmucosa e retal. As composições farmacêuticas compatíveis com cada via pretendida são bem conhecidas na técnica.

Um polipéptido da invenção pode ser utilizado como uma composição farmacêutica quando combinado com um portador farmacêuticamente aceitável. Uma composição assim pode conter, além de um polipéptido da invenção, portadores, vários diluentes, enchimentos, sais, tampões, estabilizadores, solubilizantes e outros materiais bem conhecidos na técnica. O termo "farmacêuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfere com a eficiência da atividade biológica dos ingredientes ativos. As características do portador dependerão da via de administração.

A composição farmacêutica da invenção também pode conter agentes ou fatores terapêuticos adicionais para o tratamento do distúrbio específico escolhido como alvo. Por exemplo, uma composição farmacêutica para o tratamento da diabetes tipo 2 também pode incluir um agente antidiabético oral. A composição farmacêutica pode conter fatores trombolíticos ou antitrombóticos, tais como ativador do plasminogénio e Fator VIII. A composição farmacêutica pode ainda conter agentes anti-inflamatórios. Esses fatores e/ou agentes adicionais podem ser incluídos na composição

farmacêutica para produzir um efeito sinérgico com um polipéptido da invenção, ou para minimizar os efeitos secundários causados pelos polipéptidos da invenção.

A composição farmacêutica da invenção pode encontrar-se na forma de um lipossoma no qual um polipéptido da invenção é combinado, além de outros portadores farmacêuticamente aceitáveis, com agentes anfipáticos, tais como lípidos que existem na forma agregada como micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos ou camadas lamelares na solução aquosa. Os lípidos adequados para a formulação de lipossoma incluem, sem limitação, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatídeos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, etc.

Conforme aqui utilizado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade total de cada componente ativo da composição farmacêutica ou do método que é suficiente para apresentar um benefício significativo para o paciente, p. ex., melhoramento dos sintomas, cura ou aumento da taxa de cura dessas condições. Quando aplicado a um ingrediente ativo individual, administrado sozinho, o termo refere-se somente a esse ingrediente. Quando aplicado a uma combinação, o termo refere-se a quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, quer administrados em conjunto, em série ou em simultâneo.

Na prática do método de tratamento ou na utilização da presente invenção, é administrada uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido da invenção num sujeito, p. ex., um mamífero (p. ex., um ser humano). Um polipéptido da invenção pode ser administrado de acordo com o método da invenção, sozinho ou em conjunto com outras terapias. Quando coadministrado com um ou mais agentes, um polipéptido da invenção pode ser administrado em simultâneo com o segundo agente ou em sequência. Se administrado em sequência, o médico assistente irá decidir sobre a

sequência apropriada de administração dos polipéptidos da invenção em conjunto com outros agentes.

Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido da invenção é administrada oralmente, o agente de ligação encontrar-se-á na forma de um comprimido, uma cápsula, um pó, uma solução ou um elixir. Quando administrada na forma de comprimido, a composição farmacêutica da invenção pode conter adicionalmente um portador sólido, tal como uma gelatina ou um adjuvante. O comprimido, a cápsula e o pó contêm entre cerca de 5 e 95% de agente de ligação e, preferencialmente, entre cerca de 25 e 90% de agente de ligação. Quando administrada na forma líquida, é possível adicionar um portador líquido, tal como água, petróleo, óleos de origem animal ou vegetal, tal como óleo de amendoim (tendo cuidado em relação a alergias a amendoim), óleo mineral, óleo de soja ou óleo de sésamo ou óleos sintéticos. A forma líquida da composição farmacêutica pode ainda conter solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacáridos ou glicóis, tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol. Quando administrada na forma líquida, a composição farmacêutica contém entre cerca de 0,5% e cerca de 90% em peso do agente de ligação e, preferencialmente, entre cerca de 1% e cerca de 50% em peso do agente de ligação.

Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido da invenção é administrada por injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, o polipéptido da invenção encontrar-se-á na forma de uma solução aquosa livre de pirogénio aceitável de forma parentérica. A preparação dessas soluções de proteína aceitáveis de forma parentérica, com a devida atenção ao pH, à isotonicidade, à estabilidade e afins, faz parte das capacidades dos peritos na técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea deve conter, além do polipéptido da invenção, um veículo isotónico, tal

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 conforme conhecido na técnica. A composição farmacêutica da presente invenção também pode conter estabilizadores, conservantes, tampões, antioxidantes ou quaisquer outros aditivos conhecidos dos peritos na técnica.

A quantidade de um polipéptido da invenção na composição farmacêutica da presente invenção dependerá da natureza e gravidade da condição que está a ser tratada, e da natureza de tratamentos anteriores aos quais o paciente foi submetido. Por fim, o médico assistente decidirá a quantidade de uma composição farmacêutica ou polipéptido da invenção com a qual cada paciente deve ser tratado. Inicialmente, o médico assistente irá administrar doses pequenas de uma composição farmacêutica ou polipéptido da invenção e observar a resposta do paciente. É possível administrar doses maiores de uma composição farmacêutica ou polipéptido da invenção até ser obtido o efeito terapêutico ideal para o paciente e, nessa altura, a dosagem não será geralmente mais aumentada. Parte-se do princípio de que as várias composições farmacêuticas utilizadas para tratar um sujeito que necessite das mesmas devem conter cerca de 0,1 µg a cerca de 100 mg de um polipéptido da invenção por kg de peso corporal.

A duração da terapia intravenosa (i.v.) utilizando uma composição farmacêutica da presente invenção irá variar dependendo da gravidade da doença que está a ser tratada e da condição e potencial resposta idiossincrática de cada paciente. Parte-se do princípio de que a duração de cada aplicação de uma composição farmacêutica ou um polipéptido da presente invenção pode variar, p. ex., entre 1 e 12, 6 e 18 ou 12 e 24 h de administração i.v. contínua ou intermitente. É igualmente contemplada a terapia subcutânea (s.c.) utilizando uma composição farmacêutica da presente

invenção. Estas terapias podem ser administradas todos os dias, semanalmente ou, mais preferencialmente, duas vezes por semana ou mensalmente. Por fim, o médico assistente decidirá sobre a duração apropriada da terapia i.v. ou s.c., ou terapia com uma molécula pequena, e a duração de administração da terapia, utilizando a composição farmacêutica da presente invenção.

EXEMPLOS

Os Exemplos que se seguem são apresentados para ajudar na compreensão da invenção, mas não pretendem ser, e não devem ser interpretados como, limitativos do âmbito da invenção de modo algum. Os Exemplos não incluem descrições detalhadas de métodos convencionais, tais como técnicas de ADN recombinantes. Esses métodos são bem conhecidos dos peritos na técnica.

Exemplo 1

Quantificação da Composição de Aminoácidos de Células CHO

Para quantificar a composição de aminoácidos de células CHO de expressão de anticorpos e células CHO de expressão de proteínas recombinantes, isto é, a percentagem molar de cada aminoácido em relação ao total de aminoácidos da massa celular (biomassa), foi efetuado o procedimento apresentado em seguida. Resumidamente, três linhas celulares CHO que sobre-expressam anticorpos ou proteínas recombinantes, mais especificamente anticorpo anti-IL-22 (anticorpo anti-IL-22 humano recombinante), anticorpo Myo-029 (anticorpo monoclonal IgG1 anti-GDF8) e BMP-2 humano recombinante, desenvolveram-se num frasco de mistura para um dia (BMP-2) ou três dias (Myo-029 e anti-IL-22). No dia final, as culturas foram colhidas e as células giradas até uma concentração de 10^6 células/mL. Um pélete que contém 10^6 células foi lavado duas vezes com 1 X PBS, e o pélete foi novamente suspenso em 500 μ L de 5 N de HCl. A suspensão que contém células foi aquecida a 100 °C durante 24 horas e, em seguida, o vácuo da suspensão foi centrifugado. O

pélete resultante foi novamente suspenso em 500 µL de PBS, e a análise de aminoácidos foi efetuada utilizando cromatografia gasosa ou líquida.

A hidrólise ácida determinou que tanto a metionina como o triptofano diminuem durante a hidrólise ácida; deste modo, as concentrações destes aminoácidos nos Exemplos 2 e 3 basearam-se nos valores de literatura para células CHO. Além disso, foi determinado que a glutamina e a asparagina foram convertidas para as respectivas formas ácidas, ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente, durante a hidrólise; deste modo, as concentrações para estes quatro aminoácidos nos Exemplos 2 e 3 foram ajustadas com base nas relações de glutamina/ácido glutâmico e de asparagina/ácido aspártico indicadas na literatura. Sob outros aspetos, foi determinado que estas linhas celulares CHO têm composições de aminoácidos semelhantes, e valores indicados aproximadamente correspondentes para outras células de mamífero (dados não ilustrados) (consulte Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50:299 a 18).

Exemplo 2

Densidade Celular Máxima Desejada de 15×10^6 células/ml, e Título de Anticorpo Anti-IL-22 Alvo de 9 g/L em Células CHO (Linha Celular 1) com 32% de Alimentação de Volume Utilizando um Meio Concebido Racionalmente

Exemplo 2.1: Meio Concebido Racionalmente

Mediante a utilização da fórmula aqui divulgada, foi determinada a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de aminoácidos necessários para 15×10^6 células/ml que produzem 9 g/L de anticorpo anti-IL-22 na Linha Celular CHO 1 (**Tabela 6**, coluna 2) (a manutenção de células foi definida em 50%, isto é, $Y=0,5$). A concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A (**Tabela 6**, coluna 2), de uma variedade de aminoácidos foi ajustada para obter as concentrações modificadas de aminoácido total de linha de base ajustada ilustradas na coluna 3 da **Tabela**

6. Foram efetuados os seguintes ajustes: os níveis de Asn, Asp e Gln foram definidos de acordo com o Pedido de Patente Publicado U.S. n.º US2006/0121568A1; 2) como Ala, Glu, Gly foram produzidos pelas culturas de células, os respectivos níveis foram ajustados para valores inferiores; 3) o nível de Cys foi ajustado devido ao facto de a cistina também ser utilizada no meio de alimentação, e o valor de meio de cistina é definido para o indicado no Pedido de Patente Publicado U.S. n.º US2006/0121568A1; 4) os níveis de Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe são 20% a 100% superiores à concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, devido ao facto de o pó de alimentação, que contém uma composição de aminoácido definida, ter sido utilizado para criar o meio de cultura de células desejado, de modo a não ser possível uma correspondência exata. A concentração de aminoácido de meio inicial, B (**Tabela 6**, coluna 4), foi calculada a partir das concentrações modificadas de aminoácido total de linha de base ajustada ilustradas na coluna 3 da **Tabela 6**.

Tabela 6: Formulação do Meio de Cultura de Células Desejado

Aminoácido	Concentração de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM) (A)	Concentração Modificada de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM)	Concentração de Aminoácido de Meio Inicial (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

Aminoácido	Concentração de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM) (A)	Concentração Modificada de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM)	Concentração de Aminoácido Inicial (mM) (B)
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 ao Meio Concebido Racionalmente

As células da linha celular 1 (células CHO de expressão de anti-IL-22) foram obtidas a partir de frascos de mistura que contêm culturas do dia 3, e foram inoculadas em $0,7 \times 10^6$ células/ml no dia 0 para o meio de cultura de células inicial num biorreator de 1L (Applikon 2L, (Applikon Inc, Foster City, CA)). No dia 3 (cerca de 80 horas), a temperatura foi mudada de 37 °C para 31 °C e o Meio de Alimentação (consulte a coluna 4 da **Tabela 2**) foi adicionado em 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, respetivamente, para obter o meio de cultura de células desejado, que contém a concentração de aminoácido ilustrada na **Tabela 6**, coluna 3. As culturas de células foram mantidas em pH 7,0, num nível de oxigénio dissolvido de 30% e com agitação a 200 rpm. As amostras foram recolhidas diariamente para testar a densidade celular (instrumentos de contagem de células CEDEX® (Innovatis, Malvern, PA)), a viabilidade (CEDEX®) e determinados níveis de metabolitos (Nova BioProfile Analyzer, Nova Biomedical Cooperation,

Waltham, MA). Os meios rodados para baixo foram guardados a -80 °C para a análise de título de anticorpo utilizando HPLC de Proteína A.

Os resultados são ilustrados nas **Figuras 1 e 2**. Tal como é possível observar na **Figura 1**, a densidade celular mais elevada (cerca de 11×10^6 células/mL) foi alcançada no dia 11 da cultura, com a densidade celular a diminuir em seguida. O título de anticorpo mais elevado (cerca de 7 g/L) foi obtido no dia 21 da cultura. Deste modo, o meio concebido racionalmente pode ser utilizado para produzir uma densidade celular elevada e um título de anticorpo elevado.

Exemplo 3

Densidade Celular Máxima Desejada de 15×10^6 células/ml, e Título de Anticorpo Anti-IL-22 Alvo de 10 g/L em Células CHO (Linha Celular 2) com 33% de Alimentação de Volume Utilizando um Meio Concebido Racionalmente

Exemplo 3.1: Meio Concebido Racionalmente

Mediante a utilização da fórmula aqui divulgada, foi determinada a concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A, de aminoácidos necessária para 15×10^6 células/ml e 10 g/L de anticorpo anti-IL-22 (descrito acima) (a manutenção de células foi definida em 50%, isto é, $Y=0,5$). A concentração de aminoácido de linha de base ajustada, A (**Tabela 7**, coluna 2) de uma variedade de aminoácidos foi ajustada conforme descrito no Exemplo 2 para obter as concentrações modificadas de aminoácido total de linha de base ajustada ilustradas na coluna 3 da **Tabela 7**. Além disso, para a formulação deste meio, tanto o meio de cultura de células inicial como o meio de alimentação foram preparados a partir de pós existentes com composições fixas e, deste modo, não foi possível uma correspondência exata. A concentração de aminoácido de meio inicial, B (**Tabela 7**, coluna 4), foi calculada a partir das

concentrações modificadas de aminoácido total de linha de base ajustada ilustradas na coluna 3 da **Tabela 7**.

Tabela 7: Formulação do Meio de Cultura de Células Desejado

Aminoácido	Concentração de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM) (A)	Concentração Modificada de Aminoácido de Linha de Base Ajustada (mM)	Concentração de Aminoácido Inicial (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 Concebido Racionalmente

As células da linha celular 2 (células CHO de expressão de anti-IL-22) foram obtidas a partir de frascos de mistura que contêm culturas do dia 3, e as células foram

inoculadas em $0,7 \times 10^6$ células/ml no dia 0 para o meio de cultura de células inicial num biorreator de 1L (Applikon 2L). No dia 3 (cerca de 80 horas), a temperatura foi mudada 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 obter o meio de cultura de células desejado, que contém a concentração de aminoácido ilustrada na **Tabela 7**, coluna 3. As culturas de células foram mantidas em pH 7,0, num nível de oxigénio dissolvido de 30% e com agitação a 200 rpm. As amostras foram recolhidas diariamente para testar a densidade celular (instrumentos de contagem de células CEDEX ® (Innovatis, Malvern, PA)), a viabilidade (CEDEX ®) e determinados metabolitos (analisador Nova Enzymatic). Os meios rodados para baixo foram guardados a -80 °C para a análise de título de anticorpo utilizando HPLC de Proteína A.

Os resultados são ilustrados nas **Figuras 3 e 4**. Tal como é possível observar na **Figura 3**, a densidade celular mais elevada (superior a 12×10^6 células/mL) foi alcançada no dia 10 da cultura, com a densidade celular a diminuir em seguida. O título de anticorpo mais elevado (superior a 10 g/L) foi obtido no dia 19 da cultura. Deste modo, o meio concebido racionalmente pode ser utilizado para produzir uma densidade celular elevada e um título de anticorpo elevado.

Exemplo 4

O Efeito da Adição de Prolina no Desempenho da Cultura de Células

As células CHO que produzem o anticorpo Anti-IL-22 foram cultivadas em frascos de mistura de pH controlado (frascos de 500 mL com 100 mL de volume de trabalho) e mantidas num misturador a ~100 rpm numa incubadora de 7% de CO₂ de temperatura controlada. As células foram semeadas em $0,7 \times 10^6$ células/mL. A duração da cultura foi de 18 dias. As células dos primeiros 3 dias foram mantidas a 37 °C e,

em seguida, a temperatura foi mudada para 31 °C para o resto da cultura. O pH foi controlado para os primeiros 3 dias com 1 M de bicarbonato de sódio. O meio de cultura de células consistia num meio baseado nos requisitos de cultura de células tradicional, designado por "Meio Tradicional", e no meio concebido racionalmente, isto é, meio formulado utilizando a conceção racional aqui divulgada, designado por "Meio de Conceção Racional" para alcançar 10×10^6 células/mL e 10 g/L de anticorpo. Uma principal diferença de nota entre estas duas formulações é o facto de diversos aminoácidos (PRO, THR, GLY, TYR, TRP, VAL e PHE) se encontrarem em concentrações mais elevadas no "Meio de Conceção Racional" em comparação com o "Meio Tradicional". Uma terceira condição apresentada é o meio tradicional com 3,7 mM suplementares de prolina adicionados para obter o nível de prolina no "Meio de Conceção Racional", designado por "Meio Tradicional + Prolina". Estas formulações são apresentadas na **Tabela 8** abaixo. O meio de alimentação interno de Wyeth ("Meio de alimentação", consulte a **Tabela 2**) foi adicionado à cultura num total de 23% em volume, compreendendo alimentações diárias de 2% nos dias 3 e 4, 9 a 14, 17, 1% nos dias 5 e 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 Conceção 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

1	2	3	4
Aminoácido	Meio Tradicional [mM]	Meio de Conceção Racional [mM]	Meio Tradicional + Prolina [mM]
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 destas experiências são ilustrados nas **Figuras 5 a 7**. A adição de prolina ao meio tradicional, isto é, "Meio Tradicional + Prolina" (**Figura 5**), resultou numa produção de anticorpo equivalente ao "Meio de Conceção Racional" durante o dia 14. Conforme ilustrado na **Figura 6**, todos os três meios mantiveram uma elevada densidade celular, com a densidade mais elevada apresentada no dia 12. Conforme ilustrado na **Figura 7**, todos os três meios mantiveram uma elevada viabilidade celular, com as culturas do "Meio de Conceção Racional" a manter uma maior viabilidade nos dias 15 a 18 em comparação com as culturas que contêm os meios "Meio Tradicional" e "Meio Tradicional + Prolina". Uma vez que uma variedade de outros meios, em que cada um continha uma concentração concebida racionalmente de glicina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina ou valina, não resultou em culturas de células que produzem um título de anticorpo mais elevado do que o "Meio Tradicional" (dados não ilustrados), a prolina serve como o aminoácido de limitação de taxa necessário

para alcançar um título elevado. Isto é exemplificado nas **Figuras 8A a E**, que ilustram que no dia 14 muitos dos aminoácidos no "Meio Tradicional + Prolina" alcançaram níveis extremamente baixos (note que a tirosina foi reduzida), prevenindo assim mais incorporação destes aminoácidos no anticorpo. Este resultado é igualmente observado no gráfico de títulos (**Figura 5**), uma vez que a inclinação para o "Meio Tradicional + Prolina" é reduzida após o dia 14, enquanto a produção de anticorpo é mantida durante o dia 18 para o "Meio de Conceção Racional", que contém níveis mais elevados de outros aminoácidos.

Curiosamente, a concentração de prolina no "Meio Tradicional" nunca desceu abaixo de 1 mM (**Figura 8A**); contudo, o efeito da prolina na incorporação global de aminoácido foi reduzido após o dia 11. Esta descoberta sugere que existe um limiar de prolina, isto é, a concentração de prolina tem de ser mantida acima de 1 mM em toda a cultura.

Exemplo 5

Exemplo Profético: Meio Otimizado de Cultura de Células para uma Nova Linha Celular

Os métodos de conceção de meios aqui divulgados podem ser utilizados para qualquer cultura de células, incluindo culturas de células que utilizam novas células/linhas celulares. Os meios otimizados para a utilização com uma nova linha celular iriam conter, pelo menos, uma concentração de aminoácido de linha de base ajustada, 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, ao aplicar a equação acima numa nova cultura de células, pode ser selecionado, p. ex., de 1 a 20×10^6 células/mL. Um perito na técnica poderá calcular um valor M útil ao duplicar a densidade celular máxima durante a fase de crescimento, o que pode ser calculado com base na taxa de crescimento.

Um multiplicador, N , ao aplicar a equação acima numa nova cultura de células, pode ser calculado, p. ex., multiplicando a IVC pela qp da célula. Um perito na técnica poderá calcular a IVC estimando o perfil de crescimento, seguindo os métodos descritos na secção intitulada "Formulações e Conceção Racional de Meios". Um perito na técnica poderá calcular a qp medindo a produção de anticorpo ou proteína recombinante numa base por célula.

Um fator de manutenção de células, Y , ao aplicar a equação acima numa nova cultura de células, pode ser estimado utilizando $Y=1$ (isto é, 100% dos aminoácidos necessários para a massa celular desejada) inicialmente e, em seguida, corrigindo o valor de Y (superior ou inferior).

Um fator de linha de base, F , ao aplicar a equação acima numa nova cultura de células, pode ser estimado utilizando $F=1,3$ (isto é, 30% dos aminoácidos adicionais) inicialmente e, em seguida, corrigindo o valor de F (superior ou inferior).

Exemplo 6

Efeito dos Fatores de Linha de Base e Manutenção no Desempenho da Cultura de Células

Para demonstrar que o fator de manutenção, Y , e o fator de linha de base, F , são importantes/essenciais para o desempenho de cultura de células, as células CHO de expressão anti-IL-22 foram semeadas em $0,7 \times 10^6$ células/mL e cultivadas durante 21 dias em biorreatores de 2L com um ponto de referência de pH de 7,0 e um ponto de referência de oxigénio dissolvido (OD) de 30%. O pH foi controlado por 2 N de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, e OD foi controlado por pulverização de ar (contendo 7% de CO_2). A temperatura da cultura foi de 37 °C para os primeiros 3 dias e mudada para 31 °C após o dia 3, e permaneceu em 31 °C até ao fim da cultura. As células foram cultivadas durante 21 dias nos (1) meios que contêm aminoácidos necessários tanto para o título de proteína-alvo como para a densidade celular máxima desejada

(mas que não representam o fator de manutenção ou fator de linha de base), isto é, "Meio de Conceção Racional sem manutenção e fatores de linha de base" ou no (2) "Meio de Conceção Racional".

Conforme exemplificado nas **Figuras 9 e 10**, o meio que não representa os fatores de linha de base e manutenção apresentou uma diminuição significativa na viabilidade, aproximando-se quase de 0% no dia 21 da cultura de células, e uma diminuição significativa na densidade celular. Além disso, a **Figura 11** demonstra que no dia 21 da cultura de células, este mesmo meio só podia suportar um título de anticorpo de 5 g/L.

Em oposição, o Meio de Conceção Racional (incluindo os fatores de manutenção e linha de base) apresentou uma viabilidade, uma densidade celular e títulos de anticorpos mais elevados (**Figuras 9 a 11**). No dia 21 da cultura de células, o Meio de Conceção Racional podia suportar um título de anticorpo de 10 g/L.

Estas descobertas sugerem que a representação dos fatores de manutenção e linha de base na determinação da concentração de aminoácido no meio de cultura de células desejado melhora o desempenho das células conforme medido pela viabilidade celular, densidade celular e título de polipéptido.

Exemplo 7

Purificação de Polipéptido Utilizando a Cromatografia de Troca Aniônica num Modo de Partição Fraca

Exemplo 7.1. Rastreo de alto rendimento para estabelecer condições de partição fraca e de passagem

Um estudo de rastreo inicial foi efetuado primeiro, que determinou o coeficiente de partição e/ou a concentração de produto ligado à resina em várias condições de solução, definindo assim as regiões de funcionamento de modos de partição fraca (WP) e passagem (FT) para Mab-AAB, o polipéptido de interesse e o Meio de TMAE-HiCap (M). Este

rastreio alterou a concentração de cloreto de sódio e pH para determinar os respectivos efeitos na extensão de ligação de impurezas relacionadas com o processo e Mab-AAB (Proteína A e HCP) para o meio TMAE.

Os níveis de resíduos de Proteína A nas amostras de teste foram medidos utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de Proteína A. A quantidade de agregado de alto peso molecular foi medida utilizando um ensaio de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) analítico. Os níveis de proteínas de células hospedeiras (HCPs) foram medidos utilizando um ensaio ELISA HCP. Todos os estudos de coluna e rastreio foram realizados à temperatura ambiente.

Cinquenta µL de meio TMAE HiCap foram adicionados a cada poço de uma chapa de filtro de 96 poços. Cada poço foi equilibrado nas soluções constituídas por 50 mM de glicina e uma quantidade variável de tampão Tris (dependendo da quantidade necessária para a neutralização até ao pH especificado na **Tabela 9**) e cloreto de sódio (especificado na **Tabela 10**). O pH variava entre 7,6 e 9,0, e o cloreto de sódio variava entre 0 mM e 80 mM.

As soluções de tampão utilizadas em cada fila foram diluídas num sistema de pipetas automatizado (Tecan 100 RST). A solução-mãe para os tampões era constituída por 500 mM de glicina acidificada com HCl para pH 3,0, e foi subsequentemente neutralizada com 2 M de Base Tris para os níveis de pH indicados na **Tabela 9**. Esta titulação resultou num nível de Tris que dependia do pH do tampão. O pH do tampão foi medido numa diluição de 1 para 10 da concentração do tampão habitual, que correspondia à diluição criada pelo sistema de pipetas automatizado. Como consequência da acidificação da glicina para um pH de 3,0, o tampão contribui com cerca de 10 mM de força iónica para a solução final. Foram efetuados dois desafios de carga (fluido de carga) para a resina: 5 mg/mL para medir o coeficiente de partição, K_p , e 122 mg/mL para medir a

capacidade da resina para a remoção de impurezas e do produto ligado, Q, em equilíbrio com uma solução de proteína numa concentração aproximadamente igual à concentração de carga de coluna.

Tabela 9: Tipo de tampão e Alvo de pH em Cada Poço

	Todas as colunas
A	50 mM de Glicina, 8,8 mM de Tris, pH 7,6
B	50 mM de Glicina, 13,6 mM de Tris, pH 7,8
C	50 mM de Glicina, 16,0 mM de Tris, pH 8,0
D	50 mM de Glicina, 19,6 mM de Tris, pH 8,2
E	50 mM de Glicina, 28,4 mM de Tris, pH 8,4
F	50 mM de Glicina, 37,2 mM de Tris, pH 8,6
G	50 mM de Glicina, 64,0 mM de Tris, pH 8,8
H	50 mM de Glicina, 100 mM de Tris, pH 9,0

Tabela 10: Níveis de NaCl (em mM) e Desafios de Proteína (mg/mL) em Cada Poço

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

No primeiro estágio do rastreio de alto rendimento, cada poço foi equilibrado nas condições de NaCl e pH conforme descrito nas **Tabelas 9 e 10** numa relação de volume de fase de 6:1 (300 uL de solução: 50 uL de resina). A chapa foi misturada durante 20 minutos, permitindo alcançar o equilíbrio. Em seguida, a solução foi removida através da centrifugação da chapa de filtro. Este ciclo de equilíbrio foi repetido três vezes.

No segundo estágio, a resina em cada poço foi desafiada com uma solução de MAB-AAB concentrada para 5 mg/mL de resina com uma relação de volume de 6:1 (300 uL de solução: 50 uL de resina) na concentração de NaCl e no pH apropriados. Uma solução de 36 mg/mL de Mab-AAB em 1 mM de

HEPES, 10 mM de NaCl e pH 7,0 abastecida com 300 ppm de Proteína A foi utilizada como uma solução-mãe. A chapa carregada foi misturada durante 20 minutos, permitindo o equilíbrio da resina e da solução. O sobrenadante foi removido da chapa de filtro através de centrifugação e acumulado numa chapa de recolha. A concentração de proteína no sobrenadante em cada poço foi determinada pela absorvância em A280 nm.

No terceiro estágio, a resina foi lavada adicionando soluções das condições de NaCl e pH especificadas indicadas na **Tabela 10**. O sobrenadante foi removido após a mistura durante 20 minutos. No quarto estágio, foram adicionados 2 M de NaCl para remover a proteína restante que foi ligada à resina. Os coeficientes de partição foram calculados para cada poço utilizando a massa eluída a partir dos estádios 3 e 4 e a concentração de produto a partir do estágio 2, e são ilustrados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Coeficientes de Partição (Kp) para o Rastreo HTS de 96 poços relativamente a 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 ilustrado na **Tabela 11**, o valor Kp pode ser utilizado para descrever regiões onde MAb-AAB se liga ao meio TMAE com forças diferentes. A força da ligação de MAb-AAB ao meio TMAE pode ser manipulada alterando as condições

da concentração de pH e cloreto para zonas de passagem ($K \leq 0,1$), de partição fraca ($0,1 < K < 20$) e de ligação ($K \geq 20$).

Uma amostra do sobrenadante a partir do estágio de carga de todos os poços de cada zona foi recolhida e submetida para análise de Proteína A. Os resultados do ensaio destas amostras são resumidos na **Tabela 12**. Existe uma região de pH e condutividade na qual a etapa de cromatografia TMAE fornece uma remoção muito significativa de Proteína A com uma perda limitada de proteína para a resina. Verificou-se que esta região se encontra intimamente correlacionada com o valor de coeficiente de partição, K_p , e não com nenhuma concentração de pH ou cloreto específica.

Tabela 12: Valores de Remoção Logarítmica (LVR) de Proteína A para dados de ligação de MAb-AAB a partir do Rastreio 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

Exemplo 7.2. Séries de coluna em condições de passagem

A seguinte experiência foi efetuada no modo de passagem (FT), em que o MAb-AAB interage apenas de modo muito fraco com a coluna. Duas séries foram efetuadas com desafios de carga de 110 mg/ml e 200 mg/ml de resina.

Para todas as séries de cromatografia de troca aniônica TMAE (HiCapM) descritas, foram utilizadas as seguintes condições (as exceções são referidas nas descrições experimentais individuais).

Taxa de fluxo operacional - 150 a 300 cm/h

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

Equilíbrio 2 - conforme especificado, aproximadamente equivalente ao teor de cloreto e pH de carga

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

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

Cromatografia de Proteína A Mabselect

A cultura que contém o anticorpo monoclonal foi purificada na escala piloto utilizando uma coluna MabSelect (2389 mL) ligada a um sistema de 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 numa taxa de fluxo de 300 cm/h. Em seguida, a coluna foi carregada numa carga de aproximadamente 40 mg de produto/ml de resina. A isto seguiu-se uma lavagem de 5 volumes de coluna (VC) em 1 M de NaCl, 50 mM de Tris, pH 7,5, e uma lavagem de 5 VC que contém 10 mM de Tris, 75 mM de NaCl, pH 7,5. A coluna foi depois eluída utilizando 50 mM de glicina, 75 mM de NaCl, pH 3,0. O *pool* de produto foi neutralizado para pH 7,6 utilizando 2 M de Tris, pH 8,5. O pico neutralizado tinha uma concentração de cloreto de aproximadamente 90 mM.

Cromatografia TMAE HiCap (M)

O *pool* de Proteína A neutralizado foi mais purificado durante a etapa TMAE com as soluções de equilíbrio, carga e lavagem com um pH 7,5 com 50 mM de Tris e 75 mM de cloreto de sódio. Foram utilizados cinco volumes de coluna de lavagem. As dimensões de coluna e os desafios de carga para estes dois estudos correspondiam a: Série 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 Série 2: 7,0 cm

de diâmetro x 13 cm de altura de leito (volume - 500 mL) com uma concentração de carga de 17,6 mg/mL.

Estas condições de carga encontravam-se na região de passagem (FT) (**Tabela 13**). Os estudos de ligação em lotes (*batch*) foram utilizados para medir o coeficiente de partição (Kp), e o produto ligado foi determinado pela proteína na fita de coluna utilizando absorvância UV. Este método de determinação do produto ligado subestima habitualmente 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 no *pool* de produto foram medidos, e a extensão de remoção foi calculada. Os resultados são apresentados na **Tabela 13**. Existe uma fraca remoção de Proteína A e HMW, e uma redução modesta nos níveis HCP.

Tabela 13: Remoção de HCP, Proteína A e HMW em Condições FT

Série	Desafio de Carga (mg/mL)	Coeficiente de Partição (Kp)	Produto				
			Ligado (mg/mL de resina)	HCP (LRV)	Proteína A (LRV)	HMW (Dobra)	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 correspondiam a 38,5 ppm de ProA e 51.943 ppm de HCP (Série 1), 8,8 ppm de ProA e 25.398 ppm de HCP (Série 2).							

Exemplo 7.3. Séries de coluna em condições de partição fraca (desafio de produto elevado)

Cromatografia de Troca Aniônica TMAE (HiCap M)

Diversas séries de Proteína A Mabselect foram efetuadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 7.2 para gerar o material de carga para estas séries. O *pool* de anticorpo parcialmente purificado a partir da etapa de Proteína A foi mais purificado na coluna TMAE. A carga para

a coluna TMAE correspondia a 50 mM de Tris, pH 8,2. O diâmetro de coluna era de 0,5 cm e a altura de leito era de 10 cm (volume - 2,0 mL). A coluna foi desafiada para uma carga de 500 mg/mL de resina, com uma concentração de carga de 27,7 mg/mL.

A coluna foi equilibrada com 5 VC de uma solução contendo 50 mM de Tris, 2 M de NaCl, pH 7,5, seguindo-se outra etapa de equilíbrio compreendendo uma solução de 50 mM de Tris, pH 8,2. A coluna foi depois carregada para 500 mg de produto/ml de resina com o pico de Proteína A neutralizado a partir da etapa anterior e o produto foi recuperado no efluente da coluna durante o ciclo de carga e alguns volumes de coluna da fração de lavagem.

Estas condições de carga encontram-se na região de partição fraca. Os estudos de ligação em lotes (*batch*) foram utilizados para medir o coeficiente de partição (K_p) e a ligação de produto em elevadas concentrações de proteína. Num pH 8,2 e num teor de cloreto aproximado de 12 mM, o coeficiente de partição, K_p , é estimado como sendo 1,9 (a partir da interpolação do conjunto de dados do rastreio HTS).

Os níveis de HCP e Proteína A foram medidos em três frações durante o estágio de carga que representam os desafios de carga de aproximadamente 250, 375 e 500 mg/ml de resina. Os resultados do exemplo 7.3 são apresentados na Tabela 14. Estes resultados demonstram que é possível alcançar desafios de produto muito elevados no modo de partição fraca, sem aparecimento de impurezas. Foi alcançada uma excelente redução em HCP e Proteína A, juntamente com uma redução de 50% no teor de HMW. Em comparação com os resultados para o funcionamento no modo de passagem na **Tabela 13**, a remoção de impurezas era muito melhor no modo de partição fraca.

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

	Fração inicial (250 mg/ml)	Fração média (375 mg/ml)	Última fração (500 mg/ml)	Pool de produto final (ppm)
Ppm de HCP Residual (ng/mg de produto)	<7,6	<7,6	<7,6	<7,6
Valor de Remoção Logarítmica (LRV) de HCP	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5
Ppm de Proteína A Residual (ng/mg de produto)	0,3	Não determinada	0,1	0,6
Valor de Remoção Logarítmica (LRV) de ProA	2,9	Não determinada	2,3	2,5
HMW	Não determinada	Não determinada	Não determinada	Remoção do dobro
* As impurezas na carga correspondiam a 25.398 ppm de HCP, 99,5 ppm de Proteína A, e 2,3% de HMW				

Exemplo 7.4. Séries de coluna em condições de partição fraca (estudos da robustez)

Para confirmar mais o desempenho da coluna TMAE na região de partição fraca, foram concebidas diversas séries que alteram a concentração de pH e NaCl na carga para testar a robustez do processo. Todas as séries foram efetuadas num desafio de carga de 250 mg/ml de resina. Diversas séries de Proteína A Mabselect foram efetuadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 7.2 para gerar o material de carga para estas séries. O único fator alterado nessas séries foi a concentração de cloreto de sódio na eluição de Proteína A, que foi alterada para corresponder à concentração de NaCl na carga TMAE para uma determinada experiência. As colunas foram equilibradas com

tampões de Equil 2 e lavadas com tampões de Lavagem que tinham aproximadamente o mesmo teor de pH e cloreto de sódio da carga.

Estas condições de carga encontram-se na região de partição fraca. Os estudos de ligação em lotes (*batch*) foram utilizados para medir o coeficiente de partição (K_p). As séries foram classificadas pelos coeficientes de partição indicados na **Tabela 15**. O produto ligado foi determinado através da medição da proteína na fita de coluna utilizando a absorvância UV, e varia entre 7,8 e 25,3 mg/mL. Os resultados de Proteína A, HCP e HMW destas experiências também foram apresentados na **Tabela 15**. Verificou-se que a remoção de todas as impurezas era forte nos intervalos de funcionamento que abrangem 13,5 a 38,8 mM de cloreto total e pH 7,8 a 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 (Dobra)	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 correspondiam a 38,5 ppm de ProA e 51.943 ppm de HCP (Série 1), 8,8 ppm de ProA e 25.398 ppm de HCP (Série 2).

+ inclui a contribuição de íons Cl de NaCl, tampões e soluções tituladas

Exemplo 7.5. Sumário

A partir destes estudos, é possível observar que a remoção de Proteína A (LRV) varia fortemente com K_p , enquanto HCP LRV é excelente em todos os valores de K_p iguais ou superiores a 0,26, mas muito reduzido em $K_p = 0,17$ (em condições de passagem). A remoção de proteína de célula hospedeira é inferior em mais de um logaritmo para condições de passagem em comparação com as condições de partição fraca, mesmo para um desafio de carga reduzida. O produto ligado varia entre 7,8 e 25 mg/ml para estas condições de partição fraca nesta combinação de resina e anticorpo monoclonal. O coeficiente de partição parece ser ótimo entre $0,41 < K_p < 5,4$. Não parece ser ótimo em $K_p = 0,17$ e um produto de ligação de 1,4 a 3,3 mg/mL, as condições do Exemplo 7.2.

Estes estudos sugerem um modo alternativo de purificação de um polipéptido produzido utilizando uma cultura de células de meios de concepção racional, o que irá reduzir significativamente a presença de impurezas, agregados de alto peso molecular, ADN, proteínas de célula hospedeira, etc.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 20060121568 A [0020] [0054] [0055] [0056] [0067] [0068] [0070] [0092] [0094]
- EP 0433225 A [0040]
- US 5399677 A [0040]
- US 5168062 A [0044]
- US 4510245 A [0044]
- US 4968615 A [0044]
- US 20050070013 A [0054] [0068]
- US 372054 A [0110]
- US 11510634 B [0110]
- US 20060121568 A1 [0125]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- BIRD et al. *Science*, 1998, vol. 242, 423-26 [0033]
- HUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 5879-83 [0033]
- SONGSIVILAI; LACHMANN. *Clin. Exp. Immunol.*, 1990, vol. 79, 315-21 [0035]
- KOSTELNY et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-53 [0035]
- KOHNO. *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 185, 187-95 [0040]
- KAUFMAN et al. *Nuc. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4485-90 [0042]
- KAUFMAN. *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 185, 537-66 [0042]

- **GOEDEL.** Gene Expression Technology: Methods in Enzymology. Academic Press, 1990 **[0044]**
- Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 **[0045]**
- Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, 1992 **[0045]**
- Basic Methods in Molecular Biology. Appleton and Lange, 1994 **[0048]**
- Large-scale Mammalian Cell Culture Technology (Biotechnology and Bioprocessing Series). Marcel Dekker, 1990 **[0049]**
- **KUNAPARAJU et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, vol. 91, 670-77 **[0049]**
- **MAIORELLA et al.** *Bio/Technology*, vol. 6, 1406-10 **[0049]**
- **ROLS et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 206 (1), 115-21 **[0049]**
- **WURM; BERNARD.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, vol. 10 (2), 156-59 **[0049]**
- **SCHLAEGER; CHRISTENSEN.** *Cytotechnology*, 1999, vol. 30 (1-3), 71-83 **[0049]**
- **JORDAN et al.** *Cytotechnology*, vol. 26 (1), 39-47 **[0049]**
- **LINDELL et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, vol. 1676 (2), 155-61 **[0049]**
- **MORTON.** *In Vitro*, 1970, vol. 6, 89-108 **[0055]**
- **HAM.** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1965, vol. 53, 288-93 **[0055]**
- **MOORE et al.** *J. Am. Medical Assn.*, 1967, vol. 199, 519-24 **[0055]**
- **NYBERG et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 62, 324-35 **[0060]**
- **NADEAU et al.** *Metab. Eng.*, 2000, vol. 2, 277-92 **[0060]**
- **BONARIUS.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, vol. 50, 299-318 **[0060] [0124]**

REIVINDICAÇÕES

1. Um meio de cultura de células compreendendo entre 7 mM e 30 mM de leucina, entre 7 mM e 30 mM de lisina, entre 7 mM e 30 mM de treonina, entre 7 mM e 30 mM de prolina e entre 7 mM e 30 mM de valina.
2. Um meio de cultura de células de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda um valor igual ou superior a 3 mM de tirosina.
3. Um meio de cultura de células de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a concentração combinada de leucina, lisina, treonina, prolina e valina tem um valor entre 60% e 80% da concentração dos aminoácidos essenciais totais no meio de cultura de células.
4. Um meio de cultura de células de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a concentração combinada dos aminoácidos essenciais tem um valor entre 30% e 50% da concentração dos aminoácidos totais.
5. Um meio de cultura de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 compreendendo uma concentração total de aminoácidos com um valor entre 120 mM e 350 mM.
6. Um meio de cultura de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 compreendendo uma concentração total de aminoácidos com um valor superior a 140 mM.
7. Um método de produção de um polipéptido numa cultura de células compreendendo:
 - (1) o fornecimento de uma cultura de células, compreendendo:

a. células, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse; e

b. um meio de cultura de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6; e

(2) a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse.

8. O método de acordo com a reivindicação 7, compreendendo ainda um método de recuperação de um polipéptido purificado a partir de um fluido de carga, compreendendo as etapas de:

passagem do fluido de carga por um meio numa coluna em condições de funcionamento que fazem com que o meio ligue, pelo menos, 2,8 mg de polipéptido por mL de meio, em que o meio é selecionado a partir do grupo que consiste num meio de troca iónica carregado, uma resina de cromatografia de interação hidrofóbica e uma resina de cromatografia de afinidade de metal imobilizado; e

recuperação do polipéptido purificado a partir do efluente da coluna.

9. O método de acordo com a reivindicação 7, compreendendo ainda um método de recuperação de um polipéptido purificado a partir de um fluido de carga, compreendendo as etapas de:

passagem do fluido de carga por um meio numa coluna em condições de funcionamento definidas por um coeficiente de partição de, pelo menos, 0,1; e

recuperação do polipéptido purificado a partir do efluente da coluna.

10. Um método de produção de um polipéptido numa cultura de células compreendendo:

(1) o fornecimento de uma cultura de células, compreendendo:

a. células, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse; e

b. um meio de cultura de células inicial, em que o volume do meio de cultura de células inicial corresponde a um valor de 60 a 99% do volume de um volume do meio de cultura de células desejado;

(2) o fornecimento de um meio de cultura de células de alimentação à cultura de células de acordo com a etapa (1), em que o volume do meio de cultura de células de alimentação corresponde a um valor de 1 a 40% do volume do meio de cultura de células desejado, e em que o meio de cultura de células desejado resultante é um meio de cultura de células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6; e

(3) a manutenção da cultura de células em condições que permitem a expressão do polipéptido de interesse.

11. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, em que a cultura de células é uma cultura de células em grande escala.

12. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, em que as células são células animais.

13. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 e 10 a 12, em que o polipéptido é purificado.

14. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 13, em que o meio é um meio definido.

Figura 1

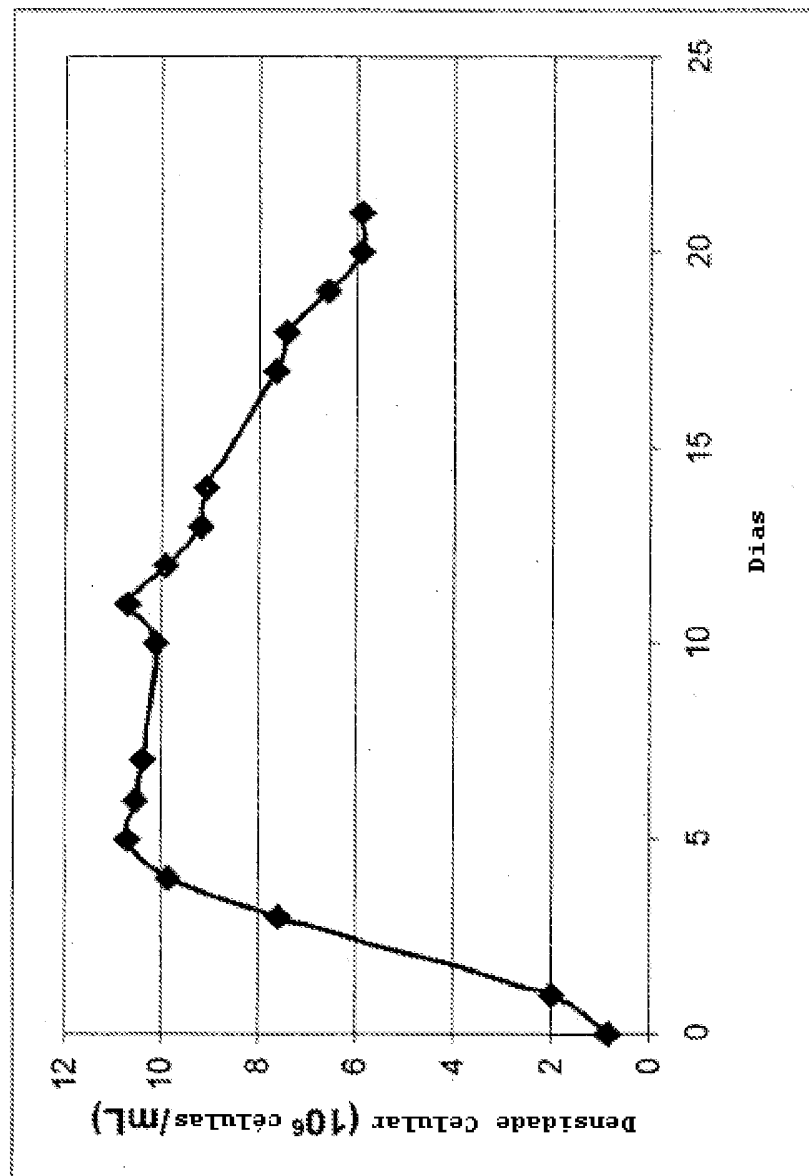


Figura 2

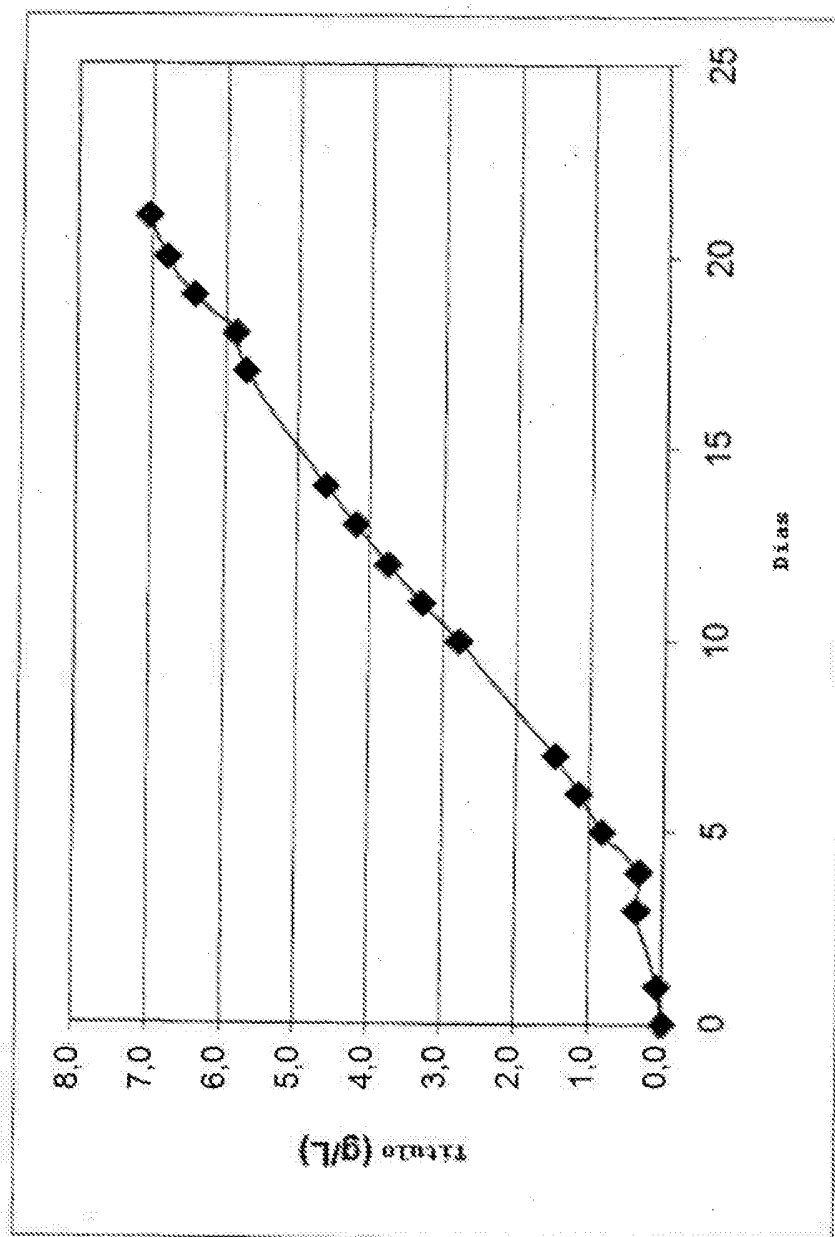


Figura 3

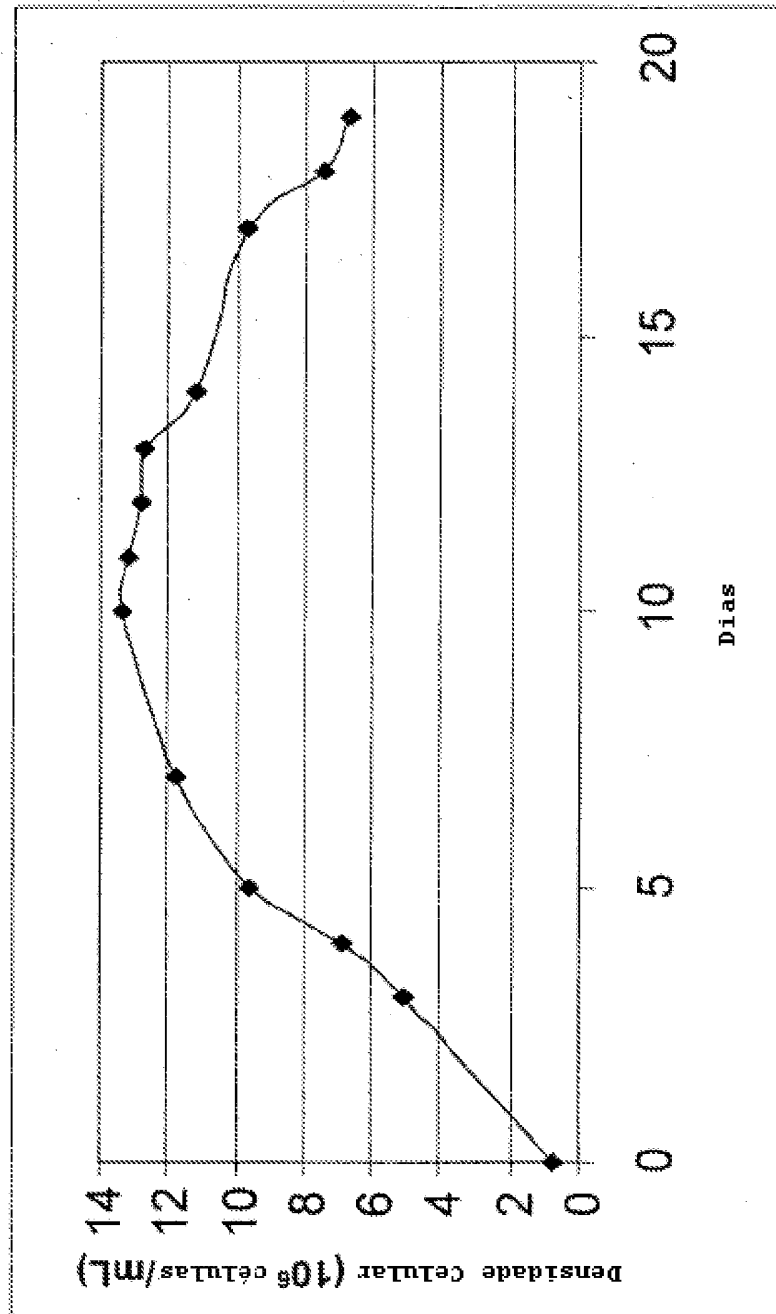


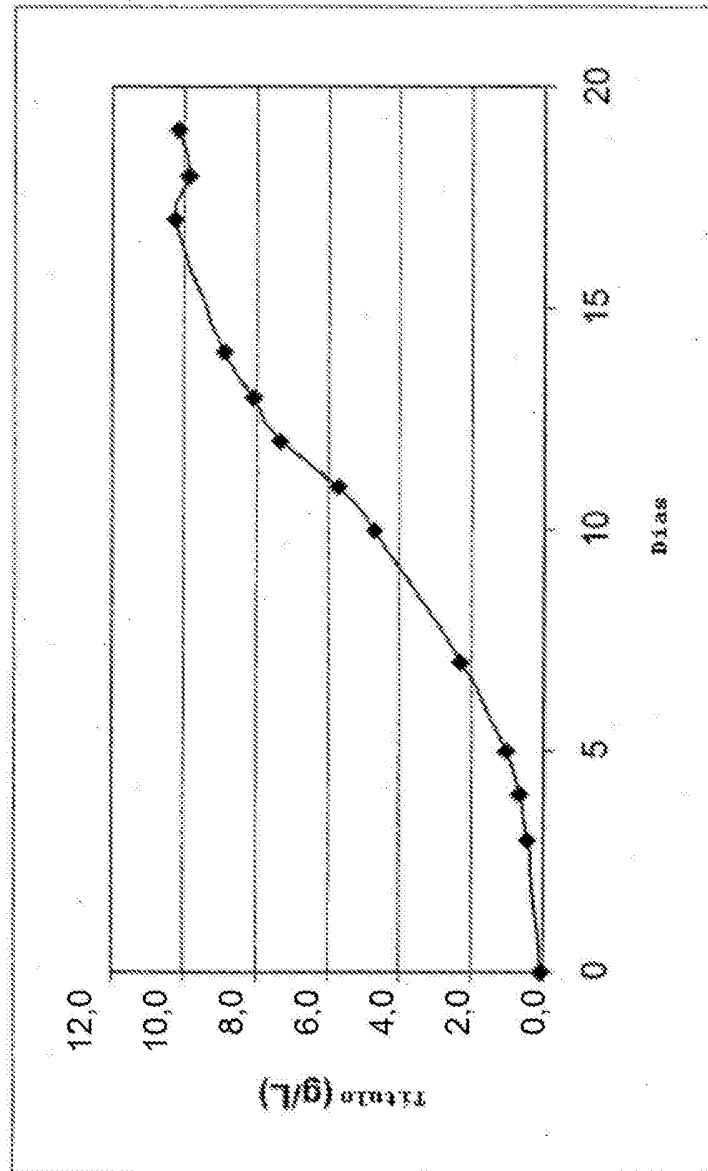
Figura 4

Figura 5

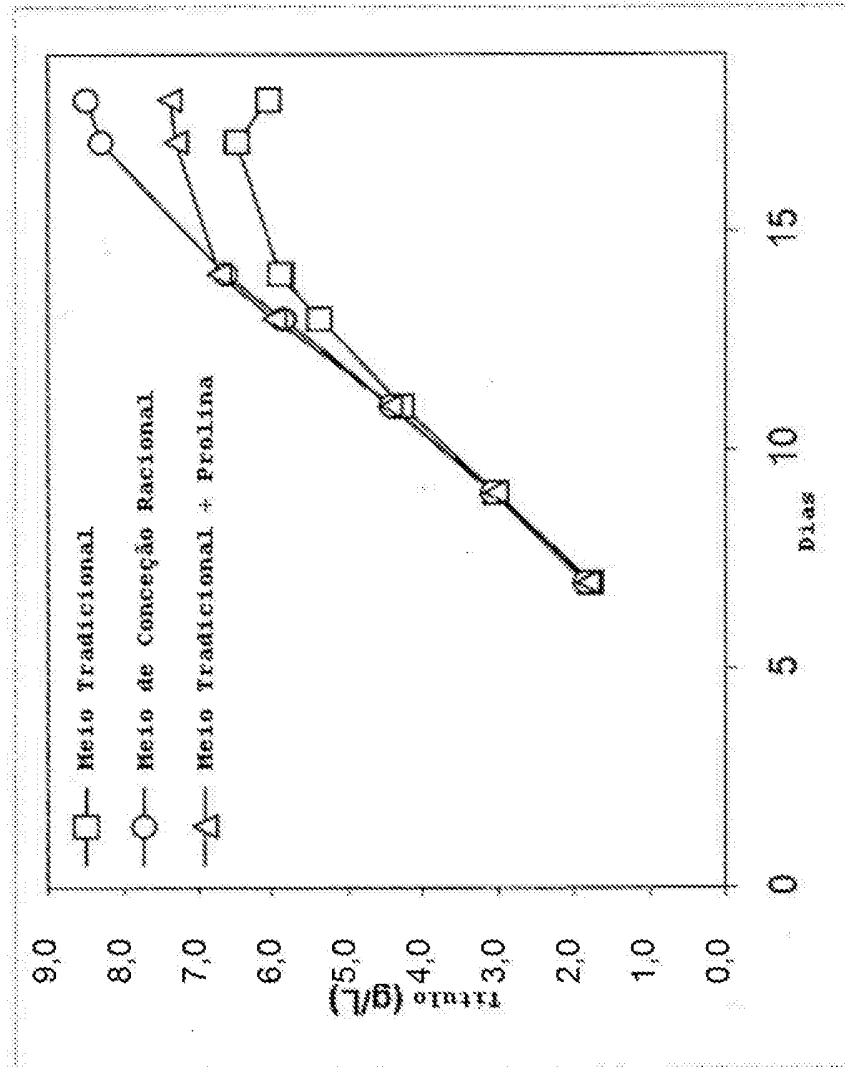


Figura 6

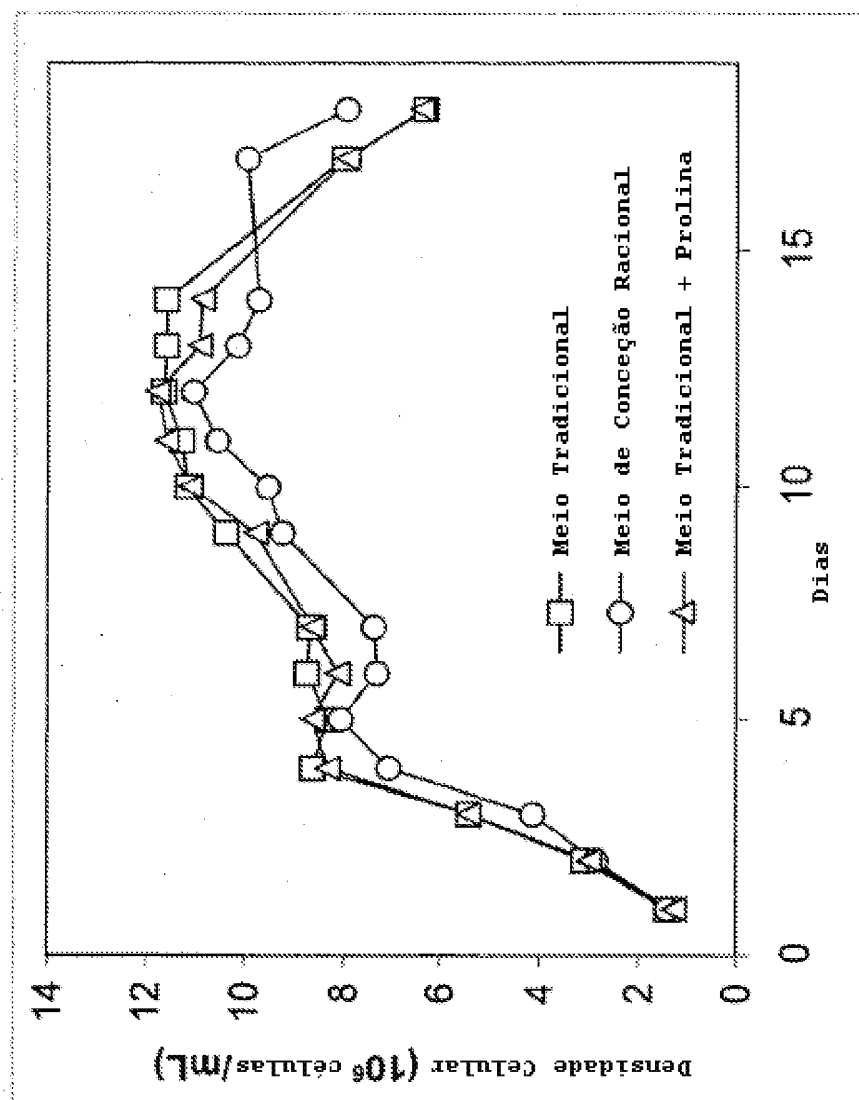


Figura 7

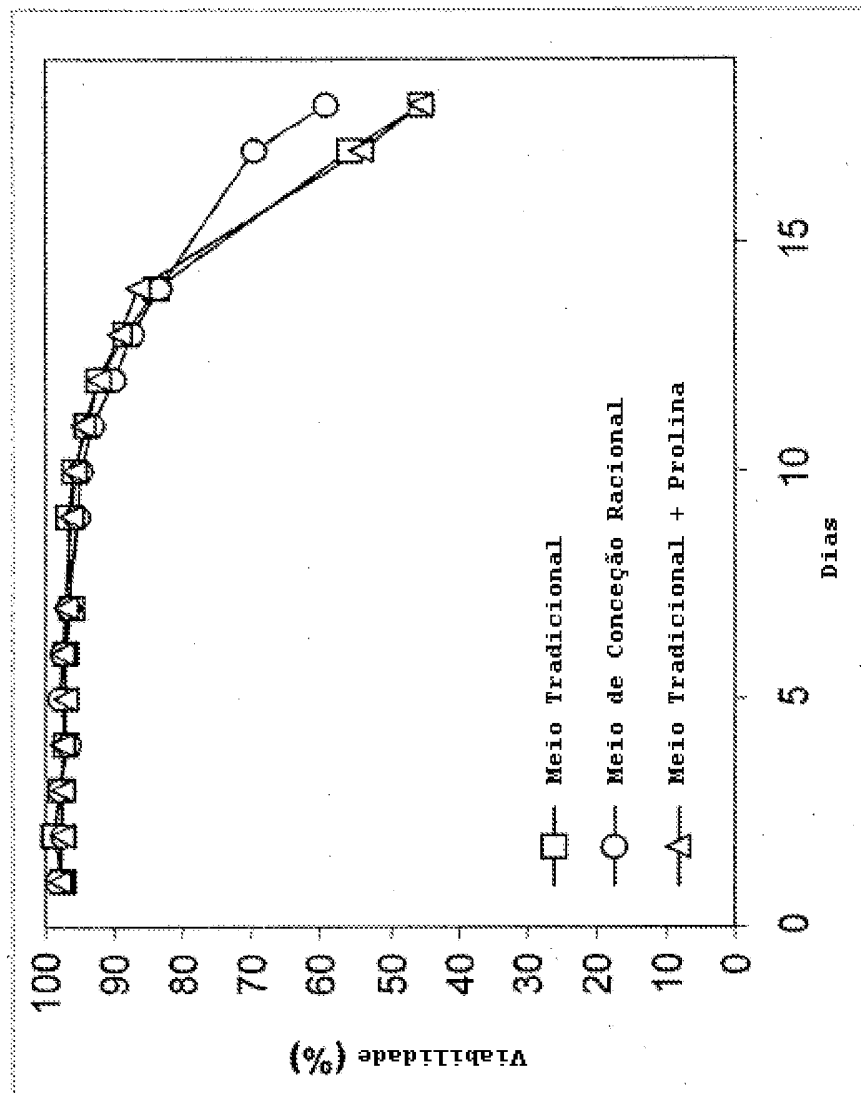


Figura 8A

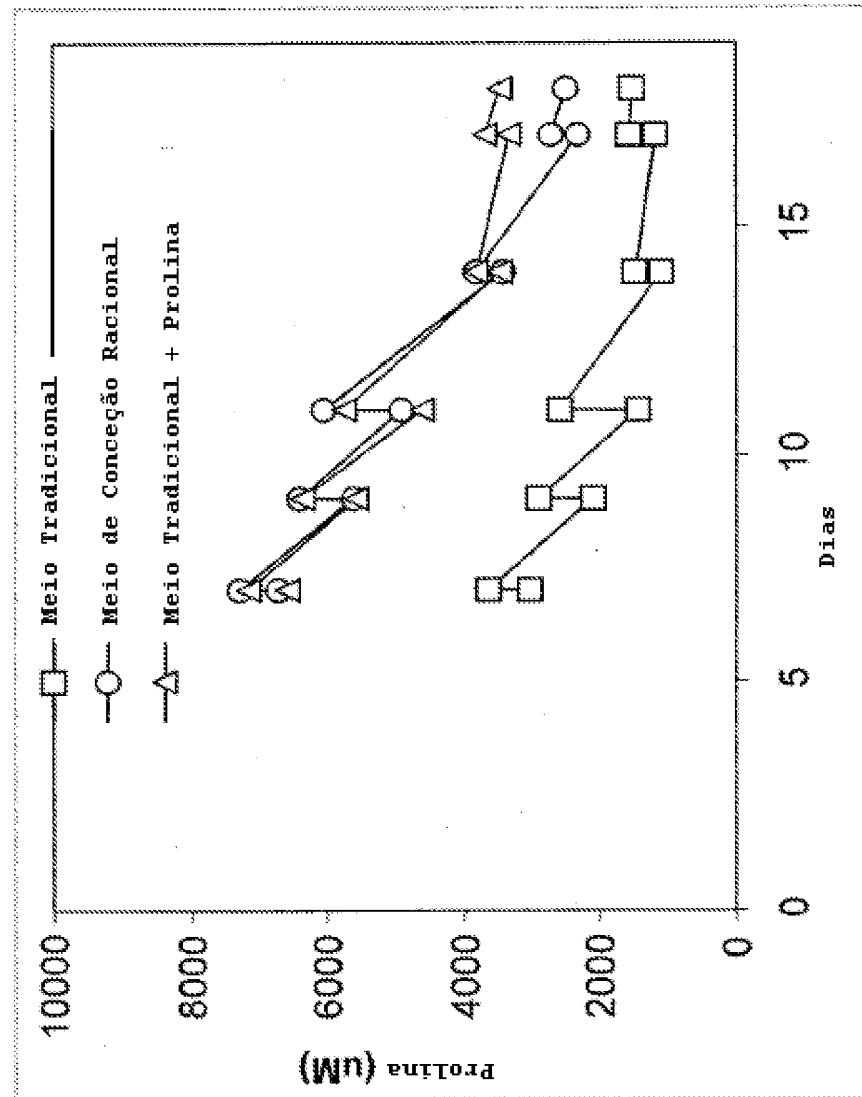


Figura 8B

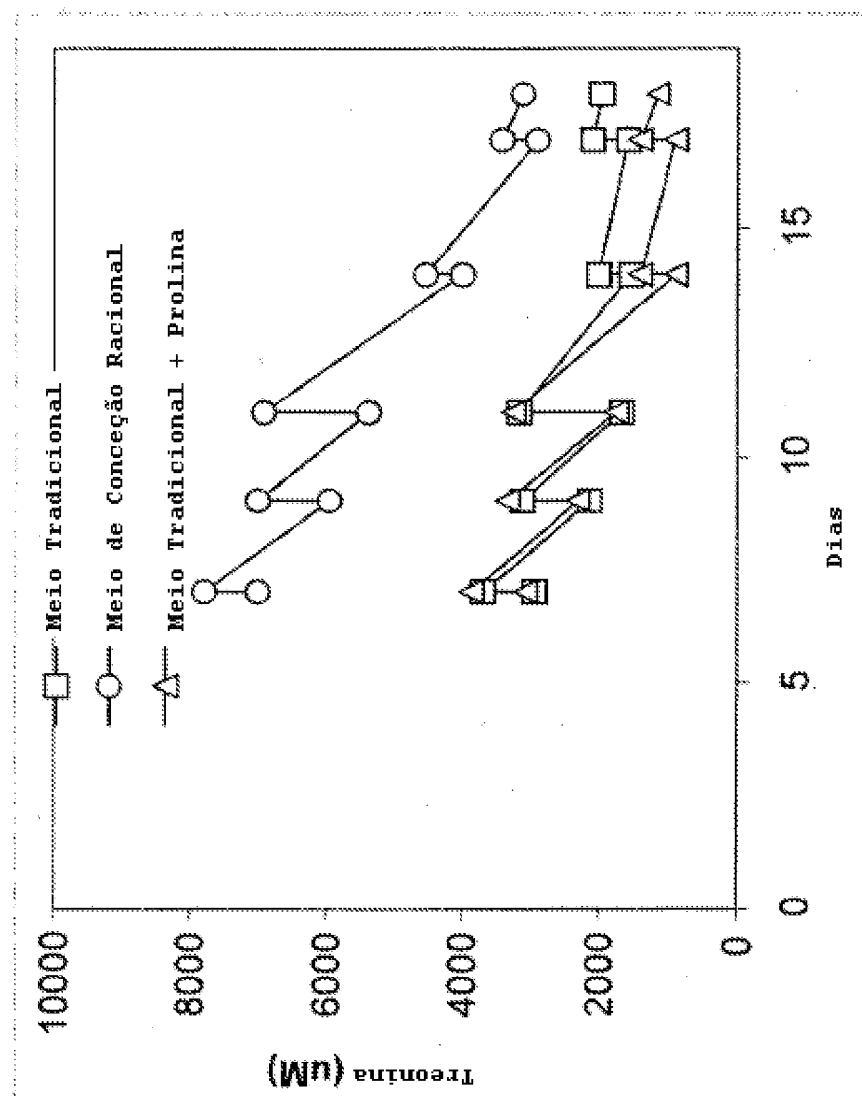


Figura 8C

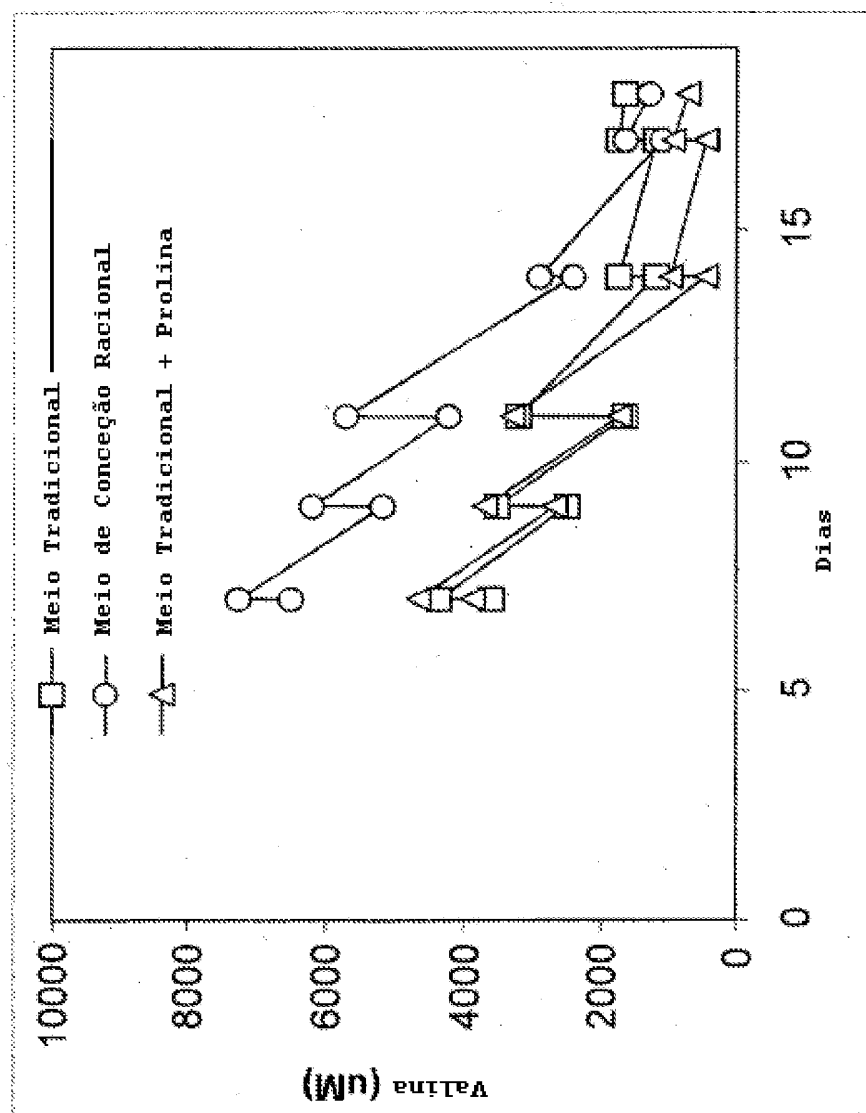


Figura 8D

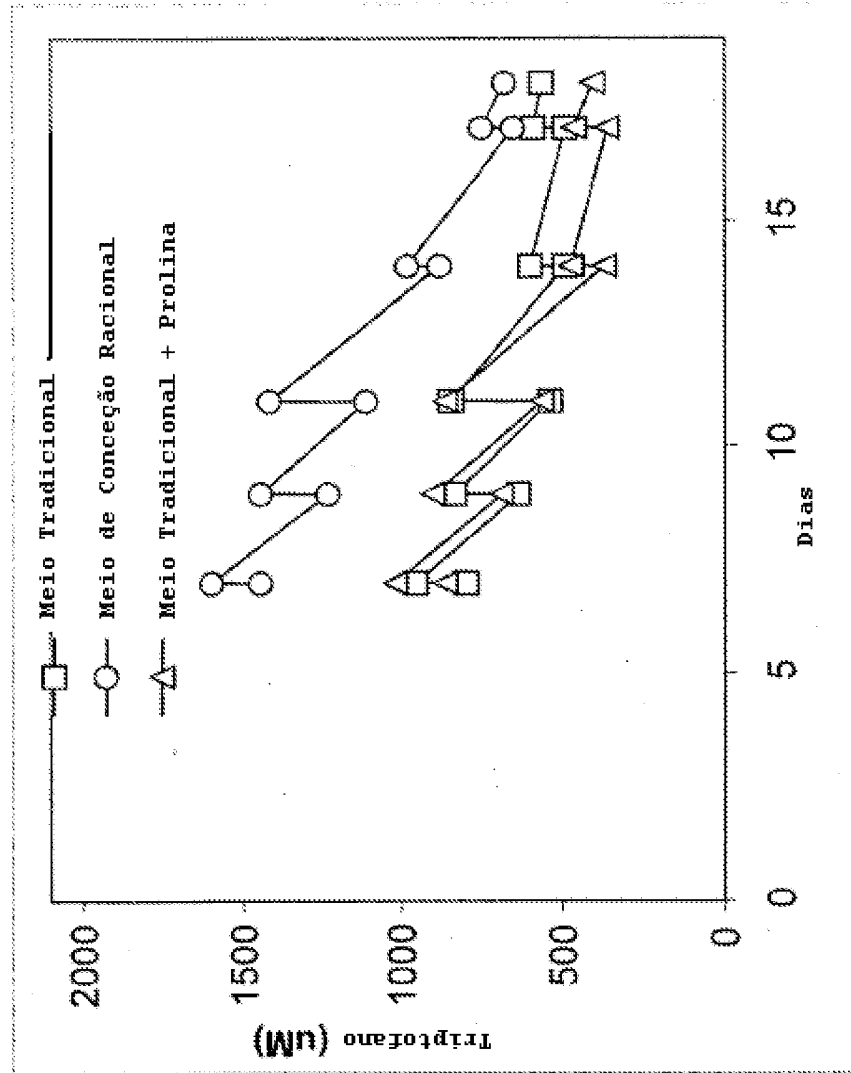


Figura 8E

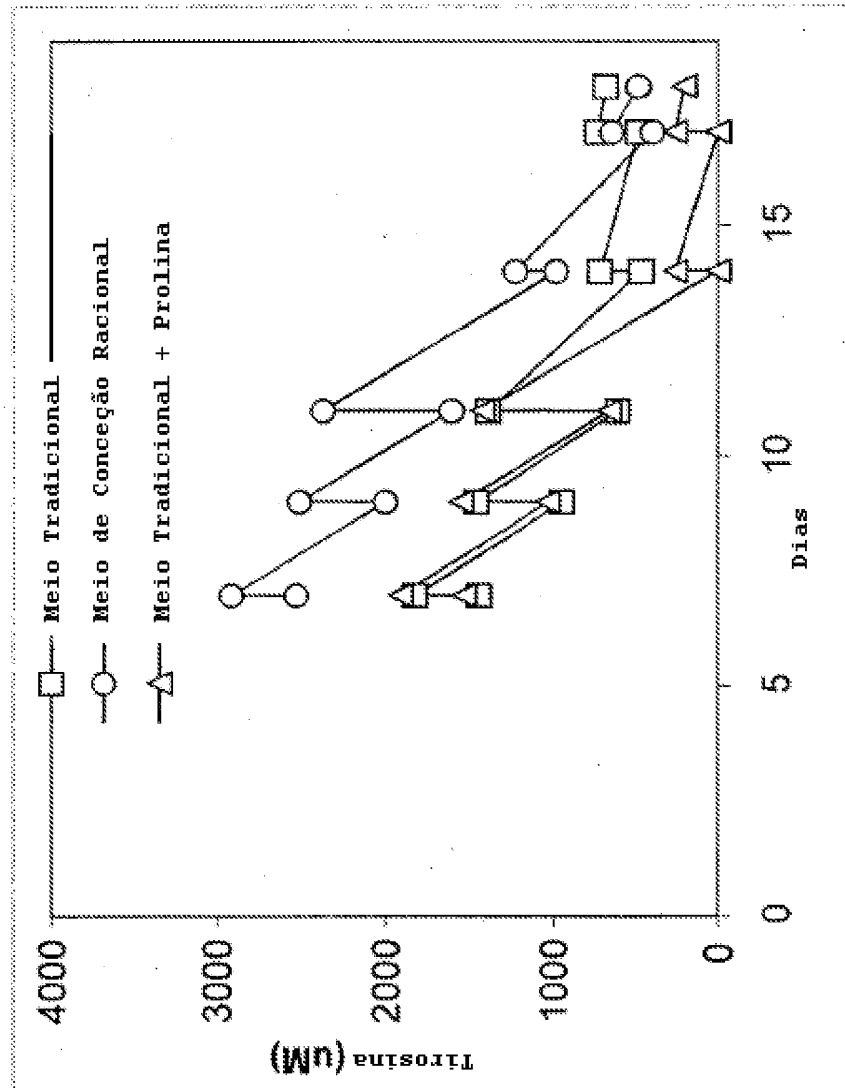


Figura 9

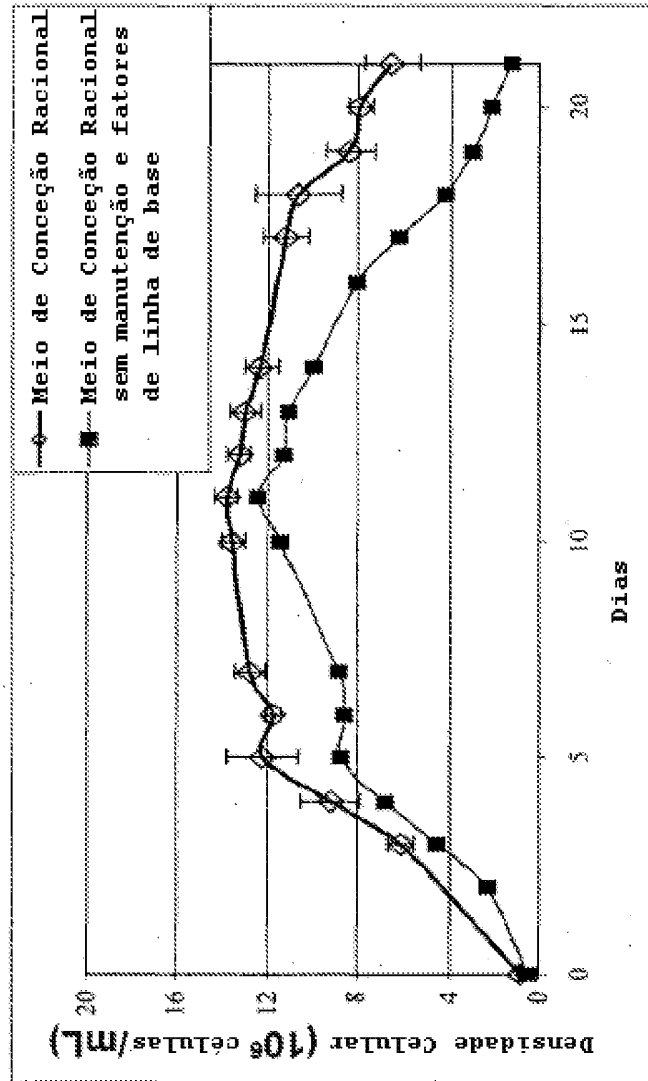


Figura 10

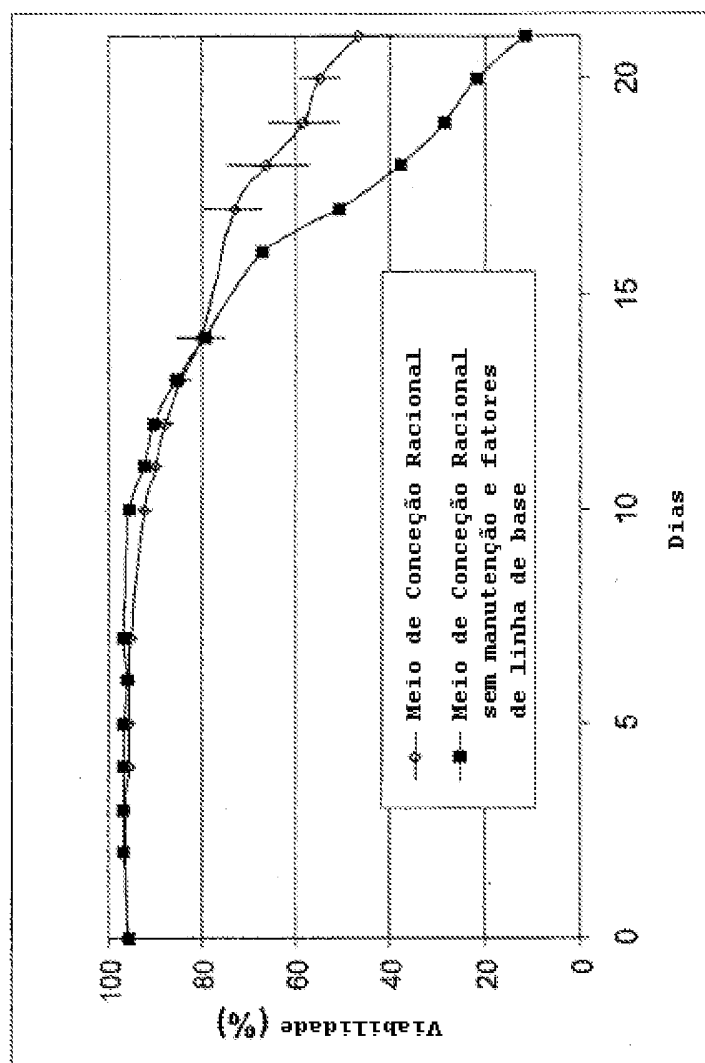


Figura 11

