



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012027434-1 B1**



**(22) Data do Depósito:** 25/04/2011

**(45) Data de Concessão:** 29/09/2020

---

**(54) Título:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE COMPREENDENDO UMA FASE DE PRODUÇÃO

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

**(30) Prioridade Unionista:** 26/04/2010 US 61/327.837.

**(73) Titular(es):** NOVARTIS AG.

**(72) Inventor(es):** WOLFGANG ERNST GUSTAV BUDACH; HELENE C.CHASSIN; KERSTIN DORSCH.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2011056509 de 25/04/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/134921 de 03/11/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/10/2012

**(57) Resumo:** MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS MELHORADO. A presente invenção refere-se a um meio de cultura de células com alto teor de cloreto de colina. Os meios de cultura de células também compreendem apenas quantidades moderadas de aminoácidos, em particular, a quantidade de glutamina nos meios de cultura de células é limitada. Os meios de cultura de células com alto teor de cloreto de colina são particularmente adequados para cultura de células descontínua alimentada, pelo que as viabilidades das células permanecem a um nível mais elevado por um tempo maior e altas titulações de polipeptídeo, embora sejam usadas quantidades limitadas de aminoácidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO  
RECOMBINANTE COMPREENDENDO UMA FASE DE  
PRODUÇÃO".**

Campo Técnico da Invenção

[001] A presente invenção se refere ao campo geral da biotecnologia, particularmente à cultura de células e a seu uso para a produção de polipeptídeos em escala industrial.

[002] A presente invenção proporciona meios de cultura de células com alto teor de cloreto de colina que permite a cultura de células com viabilidades celulares elevadas durante um período prolongado de tempo. Os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção também permitem a obtenção de elevadas produtividades de polipeptídeos e/ou de qualidade melhorada do produto, quando utilizados para a produção de um polipeptídeo por expressão recombinante de polipeptídeos, utilizando sistemas de cultura de células CHO, em particular em escala industrial.

Antecedentes Técnicos da Invenção

[003] A preparação de polipeptídeos usando tecnologia recombinante tornou-se um procedimento padrão durante o último par de décadas. O acesso aos polipeptídeos recombinantes por clonagem dos genes que codificam o polipeptídeo respectivo seguido pela transformação subsequente de hospedeiros de expressão adequados com o gene a ser expresso e produção e purificação final do produto de polipeptídeo recombinante obtido tem proporcionado o acesso a uma nova classe de substâncias terapêuticas biologicamente concebidas e produzidas.

[004] Compostos farmacologicamente ativos foram preparados em números cada vez maiores na indústria farmacêutica, utilizando tecnologia de DNA recombinante, seguido por processos de produção

desenvolvidos no campo da bioengenharia.

[005] Tais produtos biológicos incluem anticorpos monoclonais, que foram desenvolvidos para importantes opções de tratamento em vários campos da medicina, incluindo doenças autoimunes, distúrbios inflamatórios, imunossupressão, oncologia ou similares.

[006] O desenvolvimento de tais substâncias terapêuticas de origem biológica requer a produção em escala industrial, proporcionando assim o acesso a grandes quantidades de polipeptídeo recombinante. Sistemas de expressão preferidos são culturas de células de mamíferos que são superiores à maior parte dos sistemas eucarióticos, com base em células de inseto, levedura ou similares, ou até mesmo os tradicionais sistemas de expressão procarióticos.

[007] No entanto, a cultura de células de mamíferos inclui enormes desafios, especialmente à escala industrial. Instalações de produção para cultura de células de mamíferos requerem a otimização completa de muitas condições de processo.

[008] Um dos parâmetros de processo mais importantes para controlar o processo geral de produção é o meio no qual as células são cultivadas. Meios de cultura de células apropriados devem fornecer culturas de células com todos os nutrientes necessários, o que é especialmente difícil se não há componentes de origem animal, tal como soro ou proteínas, por exemplo, fatores de crescimento são adicionados aos meios.

[009] Além disso, as culturas de células de mamíferos requerem componentes suplementares particulares em diferentes estágios do processo de produção do polipeptídeo. Por conseguinte, os meios de cultura de células têm de fornecer os substratos necessários durante a) crescimento e proliferação inicial das células hospedeiras em densidades mais baixas, b) cultivo subsequente de células a alta

densidade, c) o processo real de formação de polipeptídeo em células cultivadas.

[0010] O processo geral para a produção de polipeptídeo recombinante compreende, preferivelmente, uma fase de expansão e uma fase de produção. Durante a fase de expansão, as células hospedeiras são cultivadas a elevadas densidades, usando um meio de crescimento a fim de maximizar a subsequente produção de polipeptídeo mais tarde. Durante a fase de produção, a formação real do polipeptídeo desejado em grandes quantidades é conseguida através da utilização de um meio de produção. A fim de satisfazer os requisitos metabólicos específicos das células em cada fase do processo geral de produção de polipeptídeo, composições de diferentes meios foram concebidas para as fases de expansão e produção, respectivamente. Por exemplo, os meios de produção muitas vezes contêm quantidades mais elevadas de aminoácidos do que o meio de crescimento.

[0011] Consequentemente, esforços consideráveis foram tomados no passado para desenvolver meios de cultura de células com especial ênfase na sua utilização para a produção em larga escala de polipeptídeos. No entanto, a melhoria contínua de meios de cultura de células é ainda um objetivo importante, a fim de maximizar ainda mais a produção de polipeptídeo em termos de qualidade do produto e rendimentos quantitativos.

[0012] Muitos componentes dos meios de cultura de células foram investigados no passado em termos do seu papel para a produção de polipeptídeos. Possíveis objetivos são sais inorgânicos, aminoácidos, fontes de carbono como glicose, ou vitaminas.

[0013] Por exemplo, demonstrou-se que a suplementação de compostos como vitaminas, cloreto de colina ou aminoácidos pode aumentar a viabilidade e produtividade de células cultivadas sob

condições isentas de proteínas (Kim do Y et. al., Cytotechnology 2005, 47, 37-49).

[0014] Cloreto de colina é um componente normal de meios de cultura de células, que serve como um precursor fosfolipídico para as células. Depois de ter sido recolhido e processado pelas células, se acaba, além de fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol como um dos principais fosfolipídios nas membranas celulares denominados fosfatidil colina.

[0015] Meios de cultura de células comumente utilizados como D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e D-MEM/F-12 têm sido amplamente utilizados para o crescimento de uma vasta gama de linhagens de células de mamíferos. Estes meios incluem quantidades de cloreto de colina de 4 mg/L e 8,98 mg/L, respectivamente.

[0016] Outros meios comercialmente disponíveis como Ham's F-12 (disponível comercialmente por BioConcept) e MEM (comercialmente disponível por HyClone) compreendem também pequenas quantidades de cloreto de colina de 13,96 mg/L e 56 mg/LT, respectivamente.

[0017] US 6.180.401 descreve um método aperfeiçoado para a produção de um polipeptídeo na cultura de células de animais. Um objetivo é o de aumentar a concentração do produto final. Vários parâmetros são modificados de modo a maximizar o rendimento do produto na fase de produção, incluindo a concentração de glicose, osmolalidade e concentração de glutamina. US 6.180.401 divulga meios de cultura de células, que têm um teor de cloreto de colina de 50,86 mg/L.

[0018] US 5.122.469 descreve um meio de cultura para a propagação de uma série de linhagens de células de mamíferos, em especial células de ovário de hamster chinês (CHO), e permite o cultivo de células em altas densidades como monocamadas ou em

suspensão adequada para propagação em pequena e grande escala de células de mamíferos. Uma vantagem adicional é um rendimento melhorado do produto. O meio é um meio de cultura quimicamente definido contendo níveis elevados de certos aminoácidos. O teor de cloreto de colina é 50,86 mg/L.

[0019] Apenas muito poucos meios com elevado teor de cloreto de colina são conhecidos na técnica anterior. Waymouth descreveu um meio de cultura de células que pode ser utilizado para a cultura da linhagem de células do tecido conjuntivo de fibroblastos de camundongo L929 (C. Waymouth, J. Natl. Cancer. Inst., 1959, 22, 1003-1017). Este meio é um meio quimicamente definido sintético isento de soro e tem um teor de cloreto de colina de 250 mg/L. Este meio encontra-se comercialmente disponível sob o nome de Waymouth Medium MB 752/1 (BioConcept e Sigma-Aldrich). A aplicabilidade conhecida limita-se à cultura de órgão inteiro, o estabelecimento de linhas celulares de carcinoma de efusões pleurais e o crescimento de células potencialmente tumorigênicas antes da sua avaliação in vivo.

[0020] WO 02/101019 descreve duas composições de meio com teor relativamente elevado de cloreto de colina, 101,72 mg/L e 209,40 mg/L, respectivamente. Estes meios foram usados para estudar o impacto da glutamina e glutamato para a produção de proteína recombinante. No entanto, ambos os meios ainda continham grandes quantidades de glutamina.

[0021] É limitada a informação disponível a partir da técnica anterior quanto ao papel do teor de cloreto de colina em meios de cultura de células para a produção de polipeptídeo em causa. US 6.048.728 discute resumidamente o papel do teor de cloreto de colina em meios de cultura de células para a produção de produtos biológicos, utilizando células de hibridoma. No caso de células que

expressam anticorpo, a secreção de quantidades máximas de anticorpos foi observada em meios contendo um suplemento de colina superior a 4 mg/L e de preferência de cerca de 4 a 75 mg/L, em conjunto com os outros reagentes do Primary Supplement. Nestas concentrações, a colina é descrita como não sendo limitante e sem toxicidade aparente.

[0022] Meios de cultura de células de produção, especialmente aqueles concebidos para utilização em produção em grande escala industrial de polipeptídeos recombinantes requerem o aumento da quantidade de componentes, por exemplo, ácidos aminados.

[0023] No entanto, os meios de cultura de células altamente concentrados mostram solubilidade limitada de componentes de meios selecionados. Solubilidade limitada representa uma desvantagem técnica porque meios altamente concentrados para produção em larga escala suportam o risco de precipitação de componentes individuais, por exemplo, durante a fase de produção e, especialmente, durante o armazenamento. Isto pode levar a variações da composição dos meios e a uma deterioração das condições de cultura de células no ponto crítico da formação do produto.

[0024] Como outra consequência, a precipitação leva a uma remoção eficaz de componentes preciosos dos meios a partir do processo de produção real. Processos de reciclagem adicionais concebidos para superar tais inconvenientes são tecnicamente difíceis de realizar e exigem um esforço adicional em termos de recursos e tempo. Meios de cultura de células menos concentrados, quando igualmente eficazes na produção de polipeptídeo, permitiriam alcançar reduções significativas de custos em processos de produção industrial.

[0025] Considerando os desafios acima e os inconvenientes existentes, há uma necessidade contínua no campo da biotecnologia industrial para meios de cultura melhorados que permitem a produção

de polipeptídeos recombinantes a uma escala industrial com rendimentos até mais elevados, isto é, aumento da produtividade específica e geral, e o aumento da qualidade do produto. Meios de cultura de células melhorados são especialmente desejáveis para a melhoria da produtividade durante a fase de produção.

[0026] Um objetivo técnico específico dos processos de produção de polipeptídeos é o de manter as viabilidades das células mais elevadas no final do processo de produção, a fim de maximizar o rendimento final do polipeptídeo, em particular devido ao prolongamento do tempo de produção. Além disso, a redução da agregação do polipeptídeo recombinante formado e a qualidade melhorada do produto particularmente em termos de modificações pós-tradução, como o padrão de glicosilação, também são um objetivo técnico importante.

[0027] Finalmente, os meios de produção melhorados para a produção em larga escala de polipeptídeos são desejáveis, os quais contêm quantidades reduzidas de componentes ao mesmo tempo sendo igualmente eficazes, ou até melhores em termos de crescimento celular, produtividade do polipeptídeo, qualidade do polipeptídeo recombinante e funcionalidade do polipeptídeo.

#### Sumário da invenção

[0028] A fim de resolver os desafios técnicos acima referidos, a presente invenção proporciona meios de cultura de células com elevado teor de cloreto de colina, o que leva a uma melhora inesperada da produtividade específica de células e a viabilidade das células, especialmente nas fases posteriores dos processos de produção biotecnológica. Além disso, a qualidade do produto recombinante através da utilização dos meios de cultura de células também pode ser surpreendentemente melhorada. Os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção são



especialmente adequados para utilização durante a fase de produção. Por conseguinte, a presente invenção permite a produção de polipeptídeo recombinante a partir de células CHO.

[0029] Os meios de cultura de células podem ser utilizados em particular como meios de produção, a fim de atingir um crescimento celular elevado, altas densidades de células viáveis e elevada titulação de polipeptídeo durante a fase de produção. Também se verificou que a qualidade do produto, em termos de menos agregação e/ou melhor modificação pós-tradução, tal como padrão de glicosilação melhorado do produto recombinante, pode ser melhorada através da utilização dos meios de cultura de células de acordo com a presente invenção.

[0030] Na presente invenção, o cloreto de colina é preferencialmente utilizado. No entanto, outras fontes de colina, por exemplo, hidróxido de colina, tartarato/bitartarato de colina, sulfato de colina, fosfato de colina, ou qualquer outro composto de colina com base na utilização de um contraíon diferente são também adequadas para utilização em meios de cultura de células de acordo com a presente invenção. Se esses outros compostos de colina forem usados, a sua quantidade é de preferência escolhida de modo a alcançar a mesma concentração molar de colina como é conseguido usando cloreto de colina nas faixas de concentração e valores acima indicados, isto é, o outro sal de colina está de preferência presente em uma concentração equivalente à concentração do cloreto de colina tal como delineado. Isso também vale para os aspectos e modalidades específicos mencionados abaixo.

[0031] De acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, um meio de cultura de células é fornecido com um teor de cloreto de colina no intervalo de 60 mg/L a 2500 mg/L. O teor de cloreto de colina no meio de cultura de células pode ser de 80 mg/L ou mais elevado, alternativamente 160 mg/L ou mais elevado, 200 mg/L ou mais

elevado ou 220 mg/L ou mais elevado. O conteúdo do cloreto de colina no meio de cultura de células é limitado a 2500 mg/L, em alternativa 1000 mg/L, 840 mg/L, 500 mg/L ou 300 mg/L. O cloreto de colina pode estar presente em uma concentração de cerca de 240 mg/L.

[0032] O meio de cultura de células de acordo com o primeiro aspecto da invenção compreende adicionalmente apenas um teor reduzido de aminoácidos expresso por uma concentração total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L. Alternativamente, a concentração total de aminoácidos é superior a 25 mmol/L, superior a 30 mmol/L, superior a 35 mmol/L ou mesmo superior a 40 mmol/L. Além disso, a concentração total de aminoácidos pode ser inferior a 54 mmol/L. A concentração total de aminoácidos pode, por exemplo, ser de cerca de 51 mmol/L.

[0033] Além disso, o meio de cultura de células opcionalmente compreende um teor reduzido de glutamina. Em particular, a glutamina está presente em uma concentração de 500 a 1400 mg/L, em alternativa 800 a 1400 mg/L ou mesmo 900 a 1200 mg/L.

[0034] O teor de aminoácidos no meio de cultura de células de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção pode opcionalmente incluir os seguintes aminoácidos nas seguintes concentrações expressas em mmol/L:

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| Arginina        | 4,0 - 6,0, preferivelmente 4,5 - 5,5 |
| Asparagina      | 3,0 - 6,0, preferivelmente 4,0 - 5,5 |
| Ácido Aspártico | 2,5 - 4,0, preferivelmente 3,0 - 3,6 |
| Glicina         | 0,3 - 0,8, preferivelmente 0,5 - 0,7 |
| Histidina       | 0,6 - 1,0, preferivelmente 0,7 - 0,9 |
| Isoleucina      | 2,0 - 5,0, preferivelmente 3,0 - 4,0 |
| Leucina         | 3,0 - 7,0, preferivelmente 3,5 - 6,0 |
| Lisina          | 2,0 - 4,0, preferivelmente 2,5 - 3,5 |
| Metionina       | 1,0 - 1,5, preferivelmente 1,2 - 1,4 |

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| Fenilalanina | 1,0 - 2,0, preferivelmente 1,3 - 1,8 |
| Prolina      | 2,5 - 6,0, preferivelmente 3,0 - 5,5 |
| Serina       | 3,0 - 8,0, preferivelmente 4,0 - 7,0 |
| Treonina     | 2,0 - 3,5, preferivelmente 2,5 - 3,1 |
| Triptofano   | 0,4 - 1,0, preferivelmente 0,5 - 0,8 |
| Valina       | 2,5 - 5,0, preferivelmente 3,0 - 4,5 |
| Tirosina     | 1,0 - 2,0, preferivelmente 1,2 - 1,8 |
| Cistina      | 0,5 - 1,0, preferivelmente 0,6 - 0,8 |

[0035] Os meios de cultura de células são de preferência isentos de soro e isentos de proteínas. De preferência, eles também são livres de hidrolisados de proteína.

[0036] De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, um processo para a produção de um polipeptídeo recombinante é proporcionado compreendendo uma fase de produção, em que células CHO recombinantes são cultivadas em meios de cultura de células de acordo com o primeiro aspecto da invenção.

[0037] O polipeptídeo recombinante preparado é, em particular, um anticorpo recombinante.

[0038] No processo da invenção, as células são de preferência cultivadas em um processo de batelada alimentada.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[0039] Nas Figura 1 à Figura 8, os três meios são meio de crescimento com baixo teor de colina (♦ (diamante), controle 1), meio de produção (▲ (triângulo), controle 2) e meio de crescimento com elevado teor de colina, ou seja, meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com uma quantidade adicional de 200 mg/L de cloreto de colina (■ (quadrado)).

[0040] Figura 1 mostra as densidades normalizadas de células viáveis de células que expressam mAb1 cultivado em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de

células diferentes (Experiência 1).

[0041] Figura 2 representa a viabilidade das células que expressam mAb1 cultivadas em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experiência 1).

[0042] Figura 3 representa o título normalizado de polipeptídeo obtido após o cultivo das células que expressam mAb1 em frascos de agitação como uma função do tempo para três meios diferentes (Experiência 1).

[0043] Figura 4 ilustra as densidades de células viáveis normalizadas de células que expressam mAb2 cultivado em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experiência 2).

[0044] Figura 5 representa a viabilidade das células que expressam mAb2 cultivado em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experiência 2).

[0045] Figura 6 representa o título de polipeptídeo normalizado obtido após o cultivo das células que expressam mAb2 em frascos de agitação como uma função do tempo para três meios diferentes (Experiência 2).

[0046] Figura 7 representa as densidades normalizadas de células viáveis de células que expressam mAb3 cultivadas em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experimento 3).

[0047] Figura 8 representa a viabilidade das células que expressam mAb3 cultivadas em frascos de agitação como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (experiência 3).

[0048] Figura 9 mostra o título normalizado de polipeptídeo obtido

após o cultivo das células que expressam mAb3 em frascos de agitação como uma função do tempo para três meios diferentes (experiência 3).

[0049] Figura 10 mostra a taxa de agregação de mAb3 produzido depois de sete dias de cultivo em frascos de agitação. A taxa de agregação é medida por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). As barras de erro representam desvios padrão de três réplicas biológicas.

[0050] Figura 11 mostra as densidades normalizadas de células viáveis de células que expressam mAb3 cultivado em uma execução por batelada alimentada em um biorreator como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experiência 4).

[0051] Figura 12 ilustra a viabilidade de células que expressam mAb3 cultivado em uma execução por batelada alimentada de um biorreator como uma função do tempo em três meios de cultura de células diferentes (Experiência 4).

[0052] Figura 13 representa o título normalizado de polipeptídeo obtido usando células que expressam mAb3 em um funcionamento por batelada alimentada de um biorreator como uma função do tempo utilizando três meios diferentes (Experiência 4).

[0053] Figura 14 representa o título de anticorpo mAb3 normalizado obtido após 13 dias de cultura de células usando meio de crescimento de baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0054] Figura 15 representa as viabilidades de células que expressam o mAb3 no dia 13 de cultura de células usando meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0055] Figura 16 representa densidades normalizadas de células viáveis de células que expressam mAb3 a partir do dia 3 (100%) ao dia

13 usando o meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0056] Figura 17 representa a viabilidade das células que expressam mAb3 a partir do dia 3 ao dia 13, utilizando o meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0057] Figura 18 mostra o desenvolvimento normalizado de título de anticorpo mAb3 a partir do dia 3 até o dia 13 de cultura meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0058] Figura 19 representa densidades normalizadas de células viáveis de células que expressam mAb4 a partir do dia 0 ao dia 17 utilizando meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0059] Figura 20 representa a viabilidade das células que expressam mAb4 a partir do dia 0 ao dia 17 utilizando o meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0060] Figura 21 representa a viabilidade das células que expressam mAb4 no dia 17 utilizando meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0061] Figura 22 representa o título de anticorpo mAb4 normalizado a partir do dia 7 ao dia 17 utilizando o meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0062] Figura 23 representa a concentração do anticorpo mAb4 normalizada no dia 17 utilizando o meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado concentrações variáveis de cloreto de colina.

[0063] Figura 24 mostra a produtividade média normalizada

específica de células (qP) de células que expressam mAb4 obtidas no prazo de 17 dias de cultura de células, utilizando meio de crescimento com baixo teor de colina cloreto suplementado com concentrações variáveis de cloreto de colina.

#### Descrição Detalhada da Invenção

[0064] Meios de cultura de células convencionais que são utilizados para a cultura de células e a subsequente produção de polipeptídeos a partir destas culturas de células contêm apenas pequenas quantidades de cloreto de colina. Apenas muito poucos meios de cultura de células descritos na técnica anterior contêm quantidades moderadas ou mesmo elevadas de cloreto de colina. No entanto, esses meios não foram sistematicamente investigados em termos da função de quantidades elevadas de cloreto de colina sobre a produtividade específica de células, o crescimento das células e a qualidade do produto, especialmente quando utilizados durante a fase de produção.

[0065] De acordo com a presente invenção, observa-se uma melhoria inesperada da produtividade específica da célula (ou a expressão do polipeptídeo) quando do cultivo de células CHO utilizando meios de cultura de células como meio de produção que compreendem quantidades elevadas de cloreto de colina, em comparação com meios com quantidades inferiores de cloreto de colina. Demonstra-se aqui que mesmo um meio de crescimento quando suplementado com quantidades elevadas de cloreto de colina pode ser surpreendentemente utilizado como um meio de produção eficiente para o cultivo de células CHO durante a fase de produção, obtendo-se assim grandes quantidades de polipeptídeo, de preferência polipeptídeo obtido por expressão recombinante de polipeptídeo em culturas de células.

[0066] Embora o cloreto de colina seja preferencialmente utilizado

de acordo com a presente invenção, outras fontes de colina, por exemplo, hidróxido de colina, tartarato/bitartarato de colina, sulfato de colina, fosfato de colina, ou qualquer outro composto de colina com base na utilização de um contraíon diferente também é igualmente adequado para utilização em meios de cultura de células de acordo com a presente invenção.

[0067] O uso do meio de cultura de células de acordo com a presente invenção para a produção de polipeptídeos em geral envolve o cultivo de células CHO para a expressão recombinante de polipeptídeos. É preferível que o meio de cultura de células seja utilizado para a produção em larga escala de polipeptídeos. Produção em larga escala de polipeptídeos se refere às quantidades normalmente necessárias para a produção industrial de polipeptídeos recombinantes utilizados para a preparação de produtos biofarmacêuticos terapeuticamente ativos. Culturas de células de pelo menos 500 l de volume, pelo menos 1000 l, pelo L 5000 ou volumes ainda maiores representam tipicamente aplicações de produção de larga escala.

[0068] A quantidade de cloreto de colina no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção usada para a produção de polipeptídeo é significativamente mais elevada do que o teor de cloreto de colina conhecido dos meios de cultura de células anteriormente utilizados para a produção de polipeptídeo em grande escala.

[0069] Por conseguinte, a presente invenção adequada para a produção de um polipeptídeo recombinante utilizando células CHO que compreendem elevado teor de cloreto de colina, como 60 mg/L ou superior, 80 mg/L ou superior, 160 mg/L ou superior, 200 mg/L ou superior, ou mesmo 220 mg/L ou superior. O conteúdo do cloreto de colina no meio de cultura de células é limitado a 2500 mg/L, 1000 mg/L, 840 mg/L, 500 mg/L ou mesmo 300 mg/L. Cloreto de colina



pode estar presente a uma concentração de cerca de 240 mg/L.

[0070] Quanto maior a concentração de cloreto de colina, maiores são os custos para o meio. Assim, concentrações de cloreto de colina demasiado elevadas são desvantajosas do ponto de vista de custos. Além disso, o teor de cloreto de colina contribui para a osmolalidade do meio. Concentrações de cloreto de colina demasiado elevadas podem ser desvantajosas uma vez que podem conduzir, em conjunto com os outros componentes dos meios, a uma osmolalidade total que é superior ao desejado. Em particular, em processos por bateladas alimentadas não é desejável utilizar osmolalidade de partida muito elevadas, visto que isso pode impor limitações quanto à estratégia de alimentações.

[0071] Pelas razões acima, os inventores acreditam que as concentrações de cloreto de colina ideais estão dentro dos limites estabelecidos como aqui.

[0072] Se compostos de colina com exceção do cloreto de colina são utilizados, eles são empregados em concentrações equivalentes. Concentrações equivalentes significa que as concentrações molares de colina são alcançadas, as quais estão nos mesmos intervalos como alcançado quando cloreto de colina é usado em concentrações dentro dos intervalos acima.

[0073] De acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, o meio de cultura de células compreende apenas um teor limitado de aminoácidos expressos pela concentração total de aminoácidos. Mais em particular, o meio de cultura de células de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção caracteriza-se por uma concentração total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L. A concentração total de aminoácidos pode ser acima de 25 mmol/L, acima de 30 mmol/L, acima de 35 mmol/L ou mesmo acima de 40 mmol/L. Além disso, a concentração total de aminoácidos pode ser inferior a 54 mmol/L. A

concentração total de aminoácidos pode, por exemplo, ser de cerca de 51 mmol/L.

[0074] Ao mesmo tempo, a concentração de cloreto de colina é tal como acima referido, isto é, na faixa de 60 mg/L a 2500 mg/L, com faixas e valores preferidos também como acima mencionado.

[0075] O meio de cultura de células de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção pode ser utilizado em particular como meio de produção, a fim de atingir um crescimento celular elevado, altas densidades de células viáveis e elevada titulação de polipeptídeo durante a fase de produção. Além disso, o produto de maior qualidade do produto recombinante é obtido, em particular em termos de menos agregação e/ou melhores modificações pós-tradução, como padrão de glicosilação melhorado.

[0076] O papel do aminoácido glutamina para o crescimento de culturas de células e de produtividade de polipeptídeo resultante tem sido objeto de estudos extensivos nos últimos anos. Verificou-se que a glutamina é não apenas um elemento importante para a síntese de polipeptídeo, mas também constitui uma fonte de energia primária para as células de mamíferos. Deste modo, altas concentrações de glutamina foram normalmente incluídas nos meios de cultura de células utilizados para a produção de polipeptídeo. Grandes quantidades de glutamina em meios de cultura de células são importantes para o crescimento celular e expressão de polipeptídeo, particularmente em escala industrial.

[0077] No entanto, o metabolismo da glutamina resulta na decomposição da glutamina e no acúmulo de íons de amônio, que é conhecido como um subproduto sendo tóxico para o crescimento celular e produção do polipeptídeo. Por isso, é desejável limitar a quantidade de glutamina em culturas de células. Vários agentes de substituição de glutamina foram sugeridos na técnica anterior, por

exemplo, ácido glutâmico. No entanto, foi descrito que a substituição de glutamina por ácido glutâmico em processos descontínuos de alimentação conduz a uma menor formação de subproduto, mas também uma produtividade mais baixa (Doverskog et. al., J. Biotechnol., 1997, 59, 103-115). Portanto, são desejáveis meios de cultura de células contendo quantidades reduzidas de glutamina, ao mesmo tempo ainda permitindo elevado crescimento de células e produtividade de polipeptídeo.

[0078] Verificou-se que a adição de grandes quantidades de cloreto de colina permite o uso de meios compreendendo quantidades reduzidas de glutamina em comparação com alguns meios conhecidos, especialmente durante a fase de produção, embora a produtividade das células permaneça amplamente não afetada.

[0079] Assim, de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, é provido um meio de cultura de células ainda compreendendo uma quantidade opcional de glutamina que é reduzida de modo significativo quando comparado a meios da técnica anterior. Os meios de cultura de células também podem ser isentos de agentes de substituição de glutamina como ácido glutâmico ou semelhante. O meio de cultura de células compreende opcionalmente glutamina em uma concentração de 500 a 1400 mg/L, 800 a 1400 mg/L, ou 900 a 1200 mg/L.

[0080] Ao mesmo tempo, a concentração de cloreto de colina é tal como acima referido, isto é, na faixa de 60 mg/L a 2500 mg/L, com faixas e valores preferidos também como acima mencionado. Além disso, a concentração total de aminoácidos no meio de cultura de células é ao mesmo tempo de 20 a 57 mmol/L, com faixas e valores preferidos também como acima mencionados.

[0081] De acordo com outra modificação opcional do primeiro aspecto da presente invenção, as quantidades respectivas de

aminoácidos individuais são como definidas abaixo.

[0082] Tais quantidades moderadas de aminoácidos são ainda mais elevadas do que as quantidades de aminoácidos contidas em meios de cultura de células convencionais, como DMEM ou RPMI, mas ao mesmo tempo significativamente menores do que as quantidades de ácidos aminados contidos nos meios de produção típicos utilizados para produção em grande escala.

[0083] O aumento da quantidade de aminoácidos em meios de produção é considerado importante para uma elevada produtividade e elevada qualidade do produto, especialmente quando a produção de polipeptídeo é realizada em maior escala, ou mesmo em escala industrial. Foi agora constatado que a presença de quantidades elevadas de cloreto de colina permite limitar as quantidades de aminoácidos individuais, especialmente em meios de cultura de células utilizados durante a fase de produção.

[0084] O teor de aminoácidos individuais no meio de cultura de células de acordo com esta modificação opcional do primeiro aspecto da presente invenção compreende os seguintes aminoácidos nas seguintes quantidades expressas em mmol/L:

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| Arginina        | 4,0 - 6,0, preferivelmente 4,5 - 5,5 |
| Asparagina      | 3,0 - 6,0, preferivelmente 4,0 - 5,5 |
| Ácido Aspártico | 2,5 - 4,0, preferivelmente 3,0 - 3,6 |
| Glicina         | 0,3 - 0,8, preferivelmente 0,5 - 0,7 |
| Histidina       | 0,6 - 1,0, preferivelmente 0,7 - 0,9 |
| Isoleucina      | 2,0 - 5,0, preferivelmente 3,0 - 4,0 |
| Leucina         | 3,0 - 7,0, preferivelmente 3,5 - 6,0 |
| Lisina          | 2,0 - 4,0, preferivelmente 2,5 - 3,5 |
| Metionina       | 1,0 - 1,5, preferivelmente 1,2 - 1,4 |
| Fenilalanina    | 1,0 - 2,0, preferivelmente 1,3 - 1,8 |
| Prolina         | 2,5 - 6,0, preferivelmente 3,0 - 5,5 |

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| Serina     | 3,0 - 8,0, preferivelmente 4,0 - 7,0 |
| Treonina   | 2,0 - 3,5, preferivelmente 2,5 - 3,1 |
| Triptofano | 0,4 - 1,0, preferivelmente 0,5 - 0,8 |
| Valina     | 2,5 - 5,0, preferivelmente 3,0 - 4,5 |
| Tirosina   | 1,0 - 2,0, preferivelmente 1,2 - 1,8 |
| Cistina    | 0,5 - 1,0, preferivelmente 0,6 - 0,8 |

[0085] Ao mesmo tempo, a concentração de cloreto de colina é tal como acima referido, isto é, na faixa de 60 mg/L a 2500 mg/L, com faixas e valores preferidos também como acima mencionado. Além disso, a concentração total de aminoácidos no meio de cultura de células é ao mesmo tempo de 20 a 57 mmol/L, com faixas e valores preferidos também como acima mencionados.

[0086] Devido ao elevado teor de cloreto de colina, as respectivas quantidades de aminoácidos podem ser significativamente menores do que as quantidades usadas em outros meios de cultura de células utilizados para a produção em larga escala de polipeptídeos. Em outras palavras, a adição de elevadas quantidades de cloreto de colina permite reduzir significativamente a quantidade da maior parte dos aminoácidos, sem deterioração do crescimento celular, viabilidade celular e titulação de polipeptídeo. Isto tem a vantagem técnica de que meios de cultura de células com menor concentração da maior parte dos ácidos aminados incluídos podem ser utilizados a fim de evitar problemas de precipitação de componentes menos solúveis de meios de cultura de células. Além disso, significativas reduções de custo no que diz respeito aos meios de cultura de células são conseguidas, embora a qualidade geral e rendimento do produto de polipeptídeo não sejam afetados ou possam ser até mesmo melhorados. Como descrito abaixo, a agregação do produto polipeptídeo recombinante pode ser reduzida através da utilização de meios de cultura de células de acordo com a presente invenção. Adicionalmente, também foram

obtidas melhores modificações pós-tradução como padrão de glicosilação melhorado ou outros atributos de qualidade da proteína, como menor agregação do polipeptídeo recombinante. Em alguns casos, a modificação dos meios de cultura de células, como revelado pela presente invenção, ainda ajuda a aumentar a viabilidade celular e o crescimento celular, bem como a titulação de polipeptídeo resultante.

[0087] O termo "meio de cultura de células" se refere a uma solução aquosa de nutrientes que pode ser utilizada para o crescimento das células ao longo de um período de tempo prolongado. Tipicamente, os meios de cultura de células incluem os componentes a seguir: uma fonte de energia, a qual será geralmente composta de um carboidrato, de preferência glicose, aminoácidos, de preferência o conjunto básico de aminoácidos, incluindo todos os aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas e/ou outros compostos orgânicos que são requeridos em baixas concentrações, ácidos graxos livres e compostos inorgânicos incluindo elementos traço, sais inorgânicos, compostos de tamponamento e nucleosídeos e bases.

[0088] O termo "meio de crescimento" se refere a um meio de cultura de células que é normalmente utilizado durante a fase de expansão do processo geral de produção. A fase de expansão é o primeiro período do processo geral de cultivo/produção que é predominantemente caracterizado por crescimento celular elevada e uma menor produção de polipeptídeo. A fase de expansão tem a finalidade de expansão das células, o que significa a geração de um número adequado de células que se encontram na fase de crescimento exponencial para inocular um biorreator de produção.

[0089] O termo "meio de produção" se refere a um meio de cultura de células que é normalmente utilizado durante a fase de produção do processo geral de produção. A fase de produção é uma segunda fase do processo geral de cultivo/produção, que tem a finalidade de

produzir grandes quantidades de produto. Durante a fase de produção, as células devem ser mantidas em modo viável e produtivo por tanto tempo quanto possível.

[0090] O uso de meios de cultura de células no campo da indústria farmacêutica, por exemplo, para a produção de polipeptídeos recombinantes terapeuticamente ativos em geral não permite a utilização de qualquer material de origem animal, devido a questões de segurança e de contaminação. Portanto, o meio de cultura de células de acordo com a presente invenção é de preferência um meio isento de soro e/ou proteínas. O termo "meio isento de soro e/ou proteínas" representa um meio totalmente quimicamente definido, não contendo aditivos de origem animal como hidrolisados de tecidos, soro bovino fetal ou similares. Além disso, as proteínas, especialmente fatores de crescimento como insulina, transferrina ou similares, são também de preferência não adicionados à cultura de células de acordo com a presente invenção. De preferência, o meio de cultura de células de acordo com a presente invenção também não é suplementado com uma fonte de proteína hidrolisada como peptona de soja, trigo ou arroz ou hidrolisado de levedura ou similares.

[0091] O meio de cultura de células de acordo com a presente invenção pode ser utilizado em vários processos de cultura de células. A cultura de células pode ser realizada em cultura aderente, por exemplo, em cultura de monocamada ou, de preferência, em cultura em suspensão.

[0092] O cultivo em larga escala de células pode ser utilizado, por exemplo, pelos diversos processos de fermentação estabelecidos na biotecnologia industrial. Processos de cultura de células descontínuos e contínuos, como perfusão e quimiostato, podem ser utilizados usando os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção. Processos descontínuos, incluindo batelada repetida e

batelada alimentada repetida, são uma modalidade preferida.

[0093] A cultura de células em batelada inclui cultura por batelada alimentada ou cultura por batelada simples. O termo "cultura celular por batelada alimentada" se refere à cultura de células em que células e meios de cultura de células são fornecidos ao vaso de cultura inicialmente e nutrientes de cultura adicionais são alimentados continuamente ou em incrementos discretos à cultura durante o processo de cultura com ou sem célula periódica e/ou colheita de produto antes do término da cultura. O termo "cultura alimentada simples" se refere a um procedimento em que todos os componentes para a cultura de células, incluindo as células e os meios de cultura de células, são fornecidos ao vaso de cultura no início do processo de cultivo.

[0094] As células cultivadas em meio de cultura de células de acordo com a presente invenção são células CHO.

[0095] Os polipeptídeos que podem ser produzidos a partir das culturas de células e os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção não são limitados. Os polipeptídeos podem ser recombinantes ou não recombinantes. O termo "polipeptídeo" como aqui utilizado inclui moléculas compostas por uma cadeia de mais de dois aminoácidos ligados por ligações peptídicas; moléculas contendo duas ou mais tais cadeias; moléculas compreendendo uma ou mais tais cadeias sendo adicionalmente modificadas, por exemplo, por glicosilação. O termo polipeptídeo pretende englobar proteínas.

[0096] A classe preferida de polipeptídeos produzidos por culturas de células e os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção são anticorpos recombinantes.

[0097] O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e abrange especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos



multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), nanocorpos, anticorpos modificados, subunidades de anticorpos, derivados de anticorpos, anticorpos artificiais, combinações de anticorpos com proteínas e fragmentos de anticorpos suficientemente longas para exibir a atividade biológica desejada. Os anticorpos monoclonais como aqui utilizados podem ser anticorpos humanos.

[0098] No entanto, polipeptídeos que não anticorpos também podem ser produzidos utilizando culturas de células e os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção, por exemplo, polipeptídeos como proteínas transmembranas, receptores, hormônios, fatores de crescimento, proteases, proteínas de coagulação e anticoagulação, proteínas inibidoras, interleucinas, fatores de transporte, proteínas de fusão e similares. O meio de cultura de células também pode ser utilizado para a produção de vírus.

[0099] Os produtos obtidos a partir de tais processos de cultura de células podem ser utilizados para o preparo de preparações farmacêuticas. O termo "preparação farmacêutica" indica uma composição apropriada ou adaptada para administração a um mamífero, especialmente um ser humano. Além disso, a(s) proteína(s) de acordo com a invenção podem ser administradas em conjunto com outros componentes de agentes biologicamente ativos, como agentes tensoativos farmacêuticamente aceitáveis, recipientes, carreadores, diluentes e veículos.

[00100] A presença de grandes quantidades de cloreto de colina no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção permite a redução do teor de aminoácidos no meio de cultura de células sem afetar negativamente a capacidade do meio para suportar o crescimento de células em densidades elevadas e permitindo alta titulação de polipeptídeo ao mesmo tempo. Este efeito é especialmente importante para a fase de produção do processo de

produção geral.

[00101] A maioria das experiências revelou que parâmetros de desempenho ainda melhores são alcançados pelos meios de cultura de células de acordo com a presente invenção quando comparados com meios de produção convencionais compreendendo concentrações mais elevadas de aminoácidos selecionados combinados com apenas pequenas quantidades de cloreto de colina.

[00102] Apesar de não estar ligado a uma determinada teoria, supõe-se que a concentração da colina precursora de fosfolípídeo está ligada à quantidade do componente essencial da membrana celular fosfatidilcolina, o que é, além de outros fosfolípídeos, necessário para preservar a integridade e a funcionalidade das membranas celulares. Pode-se supor que as células que crescem em um meio com baixo teor de colina são limitadas neste substrato durante o processo de cultivo e, assim, em fosfatidilcolina, mesmo que a colina seja um componente não essencial dos meios e as células devem ser capazes de sintetizá-la de forma independente. No entanto, uma via inativa ou limitada pode ser a razão pelo que quantidades limitadas de colina estão disponíveis para a produção de quantidades suficientes de fosfatidilcolina. Isto pode levar a uma composição "anormal" de membranas, especialmente membranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Isto poderia influenciar negativamente a função destas membranas e reduzir as taxas de expressão do polipeptídeo ou o transporte de polipeptídeos dentro das células. A inibição do transporte de polipeptídeos a partir do complexo de Golgi para a membrana plasmática em células CHO esgotadas de fosfatidilcolina foi mostrada por Testerink et al. (2009; Journal of Lipid Research, Vol. 50, 2182-2192). Este defeito pode ser resgatado por adição de fosfatidilcolina exógena.

[00103] Diversas vantagens importantes resultam da composição

específica dos meios de cultura de células de acordo com a presente invenção.

[00104] Primeiro, a redução do teor total de aminoácidos no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção permite a realização dos processos de cultura de células com os mesmos parâmetros de desempenho técnico, ou mesmo melhores, em termos de crescimento celular, densidades de células viáveis, bem como a produtividade de polipeptídeo, enquanto, ao mesmo tempo, a redução do teor total de aminoácidos ou de alguns aminoácidos selecionados em cultura de células conduz a um melhor equilíbrio econômico geral do processo de produção, devido à redução de custos na medida em que se refere ao meio de cultura de células.

[00105] Em segundo lugar, os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção evitam o risco de precipitação de componentes contidos no meio de cultura de células, em particular aminoácidos hidrofóbicos contidos nos meios em concentrações relativamente elevadas. Isto é vantajoso, em particular, durante o armazenamento dos meios. Para estes componentes, concentrações reduzidas ajudam a evitar a deterioração do fornecimento com substrato essencial durante o crescimento das células e a produção de polipeptídeos. Isto é especialmente benéfico durante a fase de produção do processo de produção geral.

[00106] Em terceiro lugar, os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção permitem a produção de polipeptídeos recombinantes com maior qualidade. A agregação do polipeptídeo formado é reduzida, as células são capazes de produzir polipeptídeos com melhores modificações pós-tradução e os padrões de glicosilação são também melhorados.

[00107] A agregação do polipeptídeo formado durante a expressão recombinante é um problema técnico que conduz a reduzidos

rendimentos de produto. Além disso, agregação torna mais difícil purificar o produto do polipeptídeo funcionalmente ativo.

[00108] Portanto, é desejável reduzir a agregação do produto polipeptídeo formado tanto quanto possível durante o processo de produção real. Verificou-se que os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção leva à agregação reduzida de produto polipeptídeo recombinante quando comparados aos meios de produção típicos.

[00109] Muitos polipeptídeos estão sujeitos à modificação pós-tradução, especialmente a glicosilação de polipeptídeo. Os polipeptídeos resultantes compreendem cadeias de oligossacarídeos covalentemente ligados. A glicosilação é conhecida como um mediador importante da funcionalidade do polipeptídeo. Portanto, a capacidade de um sistema de célula hospedeira utilizado para a produção de polipeptídeo recombinante mimetizar de maneira adequada estruturas de glicosilação endógenas é um aspecto importante da qualidade do produto. A eficiência terapêutica de um polipeptídeo recombinante pode ser fortemente afetada pela glicosilação imprópria de polipeptídeo devido a propriedades imunogênicas e reduzida meia-vida in vivo após a administração de polipeptídeos incorretamente glicosilados.

[00110] Em geral, a manosiilação é considerada um aspecto crítico na produção de polipeptídeo recombinante, especialmente no campo dos anticorpos recombinantes. É um objetivo geral na produção de polipeptídeo recombinante evitar elevada manosiilação de polipeptídeos. Por conseguinte, é um objetivo importante reduzir tanto quanto possível a manosiilação elevada durante a produção de polipeptídeos recombinantes.

[00111] Os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção permitem a produção de polipeptídeos recombinantes em

grau muito baixo de alta manosição. Este efeito técnico é especialmente significativo no que diz respeito aos meios de produção típicos. Por exemplo, a quantidade relativa de polipeptídeo recombinante altamente manosilado com elevada manosição da quantidade total de polipeptídeo recombinante obtido a partir da expressão utilizando os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção é de preferência reduzida em cerca de 50% em comparação com o meio de produção.

[00112] Além disso, verificou-se, surpreendentemente, que os polipeptídeos recombinantes obtidos usando os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção têm maiores percentagens de  $\beta$ -galactosição em relação aos polipeptídeos correspondentes obtidos usando meios de crescimento ou meios de produção convencionais.

[00113] Outra vantagem do meio com elevadas concentrações de colina é que permite ter apenas um meio para a fase de produção e de expansão, poupando tempo e recursos.

#### Exemplos

[00114] As experiências que seguem se destinam a ilustrar adicionalmente a invenção, tal como definido neste pedido de patente.

#### Descrição dos meios de cultura de células

[00115] Os três meios a seguir são testados:

[00116] Meio de crescimento com baixo teor de colina, ou seja, com um teor de cloreto de colina de 40 mg/L (controle 1);

[00117] Meio de produção (controle 2);

[00118] Meio de crescimento com elevado teor de colina, ou seja, meio de crescimento com baixo teor de colina suplementado com uma quantidade adicional de cloreto de colina de 200 mg/L, resultando em um teor total de cloreto de colina de 240 mg/L.

[00119] Os primeiros dois meios (meio de crescimento com baixo

teor de colina baixa e de produção) são usados apenas para fins de comparação, enquanto o terceiro meio com elevado teor de cloreto de colina representa um meio de acordo com a presente invenção.

[00120] O meio de crescimento com baixo teor de colina é um meio típico concebido para o crescimento e proliferação de uma cultura de células. Este meio permite o cultivo de células até que sejam alcançadas elevadas densidades de células, o que é um requisito importante para a produção em grande escala de polipeptídeo. No entanto, o meio de crescimento com baixo teor de colina não é concebido para a produção de polipeptídeos a partir da cultura de células, porque o teor de muitos aminoácidos é baixo a moderado, considerando a concentração total de aminoácidos no meio de 51,1 mmol/L.

[00121] A composição de aminoácidos do meio de crescimento com baixo teor de colina é a seguinte:

| Aminoácido                          | mg por l de meio | Conc (mmol/L) |
|-------------------------------------|------------------|---------------|
| L-arginina, HCl                     | 1053             | 5,0           |
| Monohidrato de L-asparagina         | 616              | 4,1           |
| Ácido L-aspartico                   | 461              | 3,5           |
| Glicina                             | 38               | 0,5           |
| HCl de L-histidina H <sub>2</sub> O | 168              | 0,8           |
| L-isoleucina                        | 394              | 3,0           |
| L-leucina                           | 500              | 3,8           |
| HCl de L-lisina                     | 622              | 3,4           |
| L-metionina                         | 180              | 1,2           |
| L-fenilalanina                      | 264              | 1,6           |
| L-prolina                           | 368              | 3,2           |
| L-serina                            | 432              | 4,1           |
| L-treonina                          | 334              | 2,8           |

| Aminoácido     | mg por l de meio | Conc (mmol/L) |
|----------------|------------------|---------------|
| L-triptofano   | 102              | 0,5           |
| L-valina       | 375              | 3,2           |
| L-glutamina    | 1170             | 8,0           |
| L-tirosina     | 278*)            | 1,5           |
| L-cistina      | 200*)            | 0,8           |
| Conteúdo Total |                  | 51,0          |

\*) L-tirosina e L-cistina são adicionados ao meio de alcançar as concentrações acima indicadas de tirosina e cistina.

[00122] Em contraste com o meio de crescimento com baixo teor de colina, o segundo meio (meio de produção) é um meio útil para a produção de polipeptídeo em larga escala utilizando culturas de células. Este meio de produção contém quantidades maiores da maioria dos aminoácidos (a concentração total de aminoácidos no meio é 90,50 mmol/L), quando comparado com o meio de crescimento com baixo teor de colina, embora as quantidades de outros componentes sejam basicamente idênticas.

[00123] A composição de aminoácidos do meio de produção utilizado é a seguinte:

| Aminoácido                          | mg por l de meio | Conc (mmol/L) |
|-------------------------------------|------------------|---------------|
| L-arginina, HCl                     | 1053             | 5,0           |
| Monohidrato de L-asparagina         | 1501             | 10,0          |
| Ácido L-aspártico                   | 461              | 3,5           |
| Glicina                             | 38               | 0,5           |
| HCl de L-histidina H <sub>2</sub> O | 268              | 1,3           |
| L-isoleucina                        | 894              | 6,8           |
| L-leucina                           | 1200             | 9,2           |
| HCl de L-lisina                     | 822              | 4,5           |
| L-metionina                         | 280              | 1,9           |

| Aminoácido                                | mg por l de meio | Conc (mmol/L) |
|---|------------------|---------------|
| L-fenilalanina                            | 464              | 2,8           |
| L-prolina                                 | 968              | 8,4           |
| L-serina                                  | 1232             | 11,7          |
| L-treonina                                | 534              | 4,5           |
| L-triptofano                              | 252              | 1,2           |
| L-valina                                  | 776              | 6,6           |
| L-glutamina                               | 1169             | 8,0           |
| Sal sódico do ácido L-glutâmico hidratado | 182              | 1,2           |
| L-tirosina                                | 423*)            | 2,3           |
| L-cistina                                 | 305*)            | 1,3           |
| Conteúdo Total                            |                  | 90,7          |

[00124] O teor de cloreto de colina neste meio de produção comparativo é também significativamente superior ao meio de crescimento com baixo teor de colina. É importante notar que os meios de produção conhecidos da técnica anterior normalmente contêm quantidades muito menores de cloreto de colina. Por isso, o elevado teor de cloreto de colina no meio de produção comparativa deve ser considerado como uma diferença importante em relação aos meios de produção conhecidos da técnica anterior, que normalmente não diferencem dos meios de crescimento conhecidos quanto ao seu teor de cloreto de colina.

[00125] O terceiro meio é um meio de acordo com a presente invenção representado pelo meio crescimento com alto teor de colina, isto é, o meio crescimento com baixo teor de colina suplementado com 200 mg/L de cloreto de colina, resultando em um teor total de cloreto de colina de 240 mg/L. Com a exceção do teor mais elevado de cloreto de colina, o terceiro meio de acordo com a presente invenção pode ser ainda considerado como um meio de crescimento típico.



[00126] Os exemplos demonstram a melhoria significativa alcançada por quantidades elevadas de cloreto de colina em meios de crescimento, como o meio de crescimento com baixo teor de colina, quando utilizadas durante a fase de produção, tornando tais meios de crescimento com elevado teor de cloreto de colina não apenas muito superiores a meios suplementados com baixo teor de cloreto de colina em termos de crescimento celular, viabilidade celular e titulação de polipeptídeo, mas até mesmo superiores aos meios de produção com quantidades igualmente elevadas de cloreto de colina nos mesmos aspectos. A adição de maiores quantidades de cloreto de colina ajuda a atingir um melhor crescimento e viabilidade celular e titulação de polipeptídeo melhorada em meios de crescimento normais.

#### Configuração Experimental

[00127] Para os experimentos, uma linhagem de células CHO parentais é utilizada, que é derivada da linhagem celular dhfr (+) CHO-K1 ATCC CCL-61 (Kao *et. al*, *Genetics*, 1967, 55, 513-524, Kao *et. al.*, *PNAS*, 1968, 60, 1275-1281; Puck *et. al.*, *J. Exp. Med.*, 1958, 108, 945-959) por adaptação de condições de meios livres de proteínas, livres de soro. Três alíquotas desta linhagem celular parental são transfectadas para expressar três anticorpos monoclonais diferentes, mAb1 mAb2, mAb3, respectivamente.

#### Experiências de Frascos de Agitação (Experiências 1 a 3)

[00128] Todos os nove frascos de agitação (três para cada experimento) são executados sob as mesmas condições, exceto para o meio. As condições envolvem uma cultura por batelada alimentada com dois bolus diários começando nos dias 3 e 5, com uma taxa de alimentação de 2 e 0,4% do volume de cultura inicial por dia, uma mudança de temperatura de 36,5 °C a 33 °C no dia 5, 10% de CO<sub>2</sub> na incubadora, uma taxa de agitação de 150 rpm (raio do curso = 25 mm). O crescimento celular/viabilidade das células, bem como o título

resultante de anticorpos recombinantes expressos são determinados.

a) Experiência 1

[00129] Figura 1 e 2 mostram os resultados obtidos para as células que expressam mAb1 cultivadas na Experiência 1 em termos de crescimento e viabilidade celular.

[00130] Como ilustrado nas Figuras 1 e 2, o meio da invenção com elevado teor de cloreto de colina (meio de crescimento com elevado teor de colina) mostra um aumento de 53% na densidade máxima de células viáveis e um declínio mais lento da viabilidade quando comparado com o meio de crescimento de colina com baixo teor de cloreto de colina.

[00131] Figura 3 mostra os resultados obtidos para as células cultivadas na Experiência 1, em termos de titulação de polipeptídeo.

[00132] Como ilustrado pela Figura 3, a titulação de polipeptídeo de anticorpo recombinante obtido no meio da invenção com elevado teor de cloreto de colina (o meio de crescimento com elevado teor de colina) mostra um aumento na titulação de polipeptídeo de 330% no dia 13 em comparação com o meio de crescimento com baixo teor de colina, que tem apenas baixo teor de cloreto de colina e representa um meio de crescimento típico apenas.

[00133] Figura 3 também mostra que o meio da invenção com elevado teor de cloreto de colina até permite atingir uma titulação de polipeptídeo que é um pouco superior à titulação obtida a partir do meio de produção.

b) Experiência 2

[00134] Figuras 4 e 5 mostram os resultados obtidos para as células que expressam mAb2 cultivadas na Experiência 2 em termos de crescimento e viabilidade celular.

[00135] Como ilustrado pelas Figuras 4 e 5, o meio da invenção, com elevado teor de cloreto de colina (o meio de crescimento com

elevado teor de colina) tem apenas pequena influência sobre o crescimento das células, mas dá viabilidades significativamente mais elevadas no final do processo, quando comparado com o meio de crescimento com baixo teor de colina, que tem apenas baixo teor de cloreto de colina.

[00136] Figura 6 mostra os resultados obtidos para as células cultivadas na Experiência 2 em termos de titulação de polipeptídeo.

[00137] Figura 6 revela um aumento de 85% do título de polipeptídeo no dia 11 para o meio de cultura de células de acordo com a presente invenção quando comparado com o meio de crescimento com baixo teor de colina. Além disso, a titulação de polipeptídeo obtida no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção é ainda maior quando comparada com a titulação de polipeptídeo obtida no meio de produção tendo teor igualmente elevado de cloreto de colina.

### c) Experiência 3

[00138] Figuras 7 e 8 mostram os resultados obtidos para as células que expressam mAb3 cultivadas na Experiência 3 em termos de crescimento e viabilidade celular.

[00139] Como ilustrado pelas Figuras 7 e 8, viabilidades de células mais elevadas no final do processo de cultivo são obtidas com o meio de acordo com a presente invenção, quando comparado com o meio de cultura de células comparativo (o meio de crescimento com baixo teor de colina), que compreende somente pequenas quantidades de cloreto de colina.

[00140] Figura 9 mostra os resultados obtidos para as células cultivadas na Experiência 3 em termos de titulação de polipeptídeo.

[00141] Figura 9 revela que a titulação de polipeptídeo obtida no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção é aumentada em 145% no dia 11 quando comparado com o meio de

comparação, o meio de crescimento com baixo teor de colina. A titulação de polipeptídeo para o meio de cultura de células de acordo com a presente invenção é ainda ligeiramente superior à titulação obtida usando o meio de produção com alto teor de cloreto de colina.

[00142] Foi ainda experimentalmente confirmado que a utilização de concentrações mais elevadas de cloreto de colina no meio de produção não resultou na melhoria do crescimento celular ou titulação de polipeptídeo quando comparada com o uso do meio de produção com a quantidade normal de cloreto de colina de 240 mg/L .

[00143] As experiências adicionais seguintes são realizadas a fim de de-terminar a influência do meio de cultura de células sobre a qualidade do produto polipeptídico. Em particular, o produto é analisado a fim de determinar a influência dos meios sobre a agregação e sobre a glicosilação.

[00144] A Figura 10 mostra a taxa de agregação percentual do produto de anticorpo recombinante, em relação à quantidade total de anticorpo recombinante. A taxa de agregação no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção é reduzida em mais de 30% em relação ao meio de produção.

[00145] A expressão de mAb3 em meios de cultura de células diferentes, seguida pela análise do padrão de glicosilação dos anticorpos recombinantes demonstra que o meio de crescimento de acordo com a presente invenção com um elevado teor de cloreto de colina conduz a um anticorpo recombinante com uma baixa quantidade total de produto recombinante compreendendo elevada manosilação, o que representa um padrão de glicosilação indesejado. O uso de um meio de acordo com a invenção conduz a uma redução de mais de 55% em termos de elevada manosilação em comparação com o uso do meio de produção.

Execuções por bateladas alimentadas de biorreator Fed-batch

(Experiência 4)

[00146] A experiência a seguir é a execução por batelada alimentada no biorreator. Ela corresponde à experiência 3 acima. Células que expressam mAb3 foram utilizadas. As condições são como a seguir: volume inicial 2L; alimentação contínua de duas soluções diferentes de alimentação a partir dos dias 3 e 5 com uma taxa de alimentação de 2 e 0,4% do volume de cultura inicial por dia; uma mudança de temperatura de 36,5 °C a 33 °C no dia 5; pO<sub>2</sub> = 30%, pH = 6,9 (Deadband 0,1); controlada com CO<sub>2</sub> e NaOH a 0,5 M; taxa de agitação de 300 rpm.

[00147] Figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos para a densidade de células viáveis e percentual de viabilidade de células na Experiência 4 realizada como execução por batelada alimentada em um biorreator.

[00148] No que diz respeito ao crescimento celular e viabilidade das células, os resultados da execução por batelada alimentada no biorreator são consistentes com os resultados obtidos nas experiências de frascos de agitação. Isto é, a execução por batelada alimentada no biorreator basicamente confirma os resultados obtidos nas experiências de frascos de agitação.

[00149] Tal como na experiência de frasco de agitação, densidades de células viáveis de pico obtidas em meio de produção foram ligeiramente maiores em comparação com o meio de cultura de células da invenção (o meio de crescimento com elevado teor de colina), com elevado teor de cloreto de colina. No entanto, a percentagem de viabilidade permanece a um nível significativamente superior quando o meio de cultura de células da invenção, ou seja, o meio suplementado com elevado teor de cloreto de colina é usado em comparação ao meio de crescimento não suplementado tendo apenas baixo teor de cloreto de colina.

[00150] Figura 13 mostra os resultados obtidos quanto à titulação de polipeptídeo na Experiência 4 realizada como execução por batelada alimentada em um biorreator.

[00151] A titulação de polipeptídeo medida no dia 11 para o meio da invenção de células da invenção com elevado teor de cloreto de colina é aumentada em 170% quando comparado com o meio de crescimento comparativo tendo apenas pequenas quantidades de cloreto de colina.

[00152] Enquanto a titulação de polipeptídeo obtida para meio de cultura de células da invenção com alto teor de cloreto de colina é ainda superior à titulação de polipeptídeo obtida usando-se para fins comparativos o meio de produção nas experiências de frasco de agitação, a experiência na execução por batelada alimentada no biorreator revela uma titulação de polipeptídeo ligeiramente inferior no meio de cultura de células da invenção com elevado teor de cloreto de colina, quando comparado com o meio de produção. No entanto, a titulação de polipeptídeo obtida no biorreator utilizando o meio de cultura de células da invenção com elevado teor de cloreto de colina é muito elevada e ainda a um nível comparável com a titulação de polipeptídeo obtida por utilização para fins de comparação do meio de produção.

[00153] A experiência 4 no biorreator confirma ainda que o meio de cultura de células da invenção com elevado teor de cloreto de colina representa uma alternativa adequada aos meios de produção convencionais, permitindo alcançar titulações comparáveis de polipeptídeos, enquanto a quantidade total de aminoácidos ou as quantidades de aminoácidos selecionados podem ser significativamente reduzidas no respectivo meio de cultura de células.

[00154] A experiência 4 no biorreator também prova mais uma vez que o aumento do teor de cloreto de colina em um meio de

crescimento típico ajuda a alcançar um grande aumento da titulação de polipeptídeo quando se utiliza o meio de crescimento para a produção de polipeptídeos.

A adição de diferentes concentrações de cloreto de colina a meio de crescimento

[00155] Em um outro conjunto de experiências, cloreto de colina é adicionado em várias concentrações (40, 80, 120, 160, 200, 240, 500, 840, 1000, 3000 e 5000 mg/L no total) para o meio de crescimento em pó. Os meios assim obtidos são utilizados para a produção mAb3 e mAb4, respectivamente, em geral como descrito acima.

[00156] Concentrações de anticorpos normalizadas, densidades de células viáveis normalizadas, e viabilidades, para mAb3 e, além disso, para mAb4, a produtividade específica de células normalizada para toda a duração do cultivo (13 resp. 17 dias) são ainda ilustrado da Figura 14 à Figura 24.

[00157] Como pode ser visto a partir destes dados, os valores mais baixos em termos de viabilidade e a concentração de anticorpo após 13 ou 17 dias em cultura são obtidos em meio de crescimento com 40 mg/L de cloreto de colina no total. As concentrações de 3000 mg/L e mais não afetam de maneira negativa a viabilidade das células, mas visto que as células não crescem nos referidos meios, a concentração de anticorpo permanece abaixo de 1. Viabilidades são mais elevadas para todas as concentrações de colina superiores a 40 mg/L. Parece haver um efeito dependente da concentração de cloreto de colina sobre a viabilidade. Concentrações mais elevadas de cloreto de colina no meio resultaram em uma maior viabilidade no final do cultivo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de um polipeptídeo recombinante compreendendo uma fase de produção, caracterizado pelo fato de que:

células CHO recombinantes são cultivadas em um meio de cultura de células, e

o polipeptídeo recombinante é expresso,

sendo que o meio de cultura de células é isento de soro e isento de proteína, compreende de 60 a 2500 mg/L de cloreto de colina ou uma quantidade equivalente de outro sal de colina, e apresenta uma concentração total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L e em que o processo compreende uma mudança de temperatura a partir de uma primeira temperatura para uma segunda temperatura mais baixa.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo recombinante é um anticorpo recombinante.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que as células são cultivadas em um processo de batelada alimentada.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende 80 a 1000 mg/L de cloreto de colina ou uma quantidade equivalente de outro sal de colina.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células apresenta uma concentração total de aminoácidos de 35 a 54 mmol/L.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura



de células contém glutamina em uma concentração de 500 a 1400 mg/L.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o teor de glutamina no meio de cultura de células está em uma quantidade de 900 a 1200 mg/L.

8. Processo, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células, como definido na reivindicação 6 ou 7, compreende os aminoácidos Arginina 4,0 a 6,0 mmol/L, Asparagina 3,0 a 6,0 mmol/L, Ácido Aspártico 2,5 a 4,0 mmol/L, Glicina 0,3 a 0,8 mmol/L, Histidina 0,6 a 1,0 mmol/L, Isoleucina 2,0 a 5,0 mmol/L, Leucina 3,0 a 7,0 mmol/L, Lisina 2,0 a 4,0 mmol/L, Metionina 1,0 a 1,5 mmol/L, Fenilalanina 1,0 a 2,0 mmol/L, Prolina 2,5 a 6,0 mmol/L, Serina 3,0 a 8,0 mmol/L, Treonina 2,0 a 3,5 mmol/L, Triptofano 0,4 a 1,0 mmol/L, Valina 2,5 a 5,0 mmol/L, Tirosina 1,0 a 2,0 mmol/L e Cistina 0,5 a 1,0 mmol/L.

Fig. 1

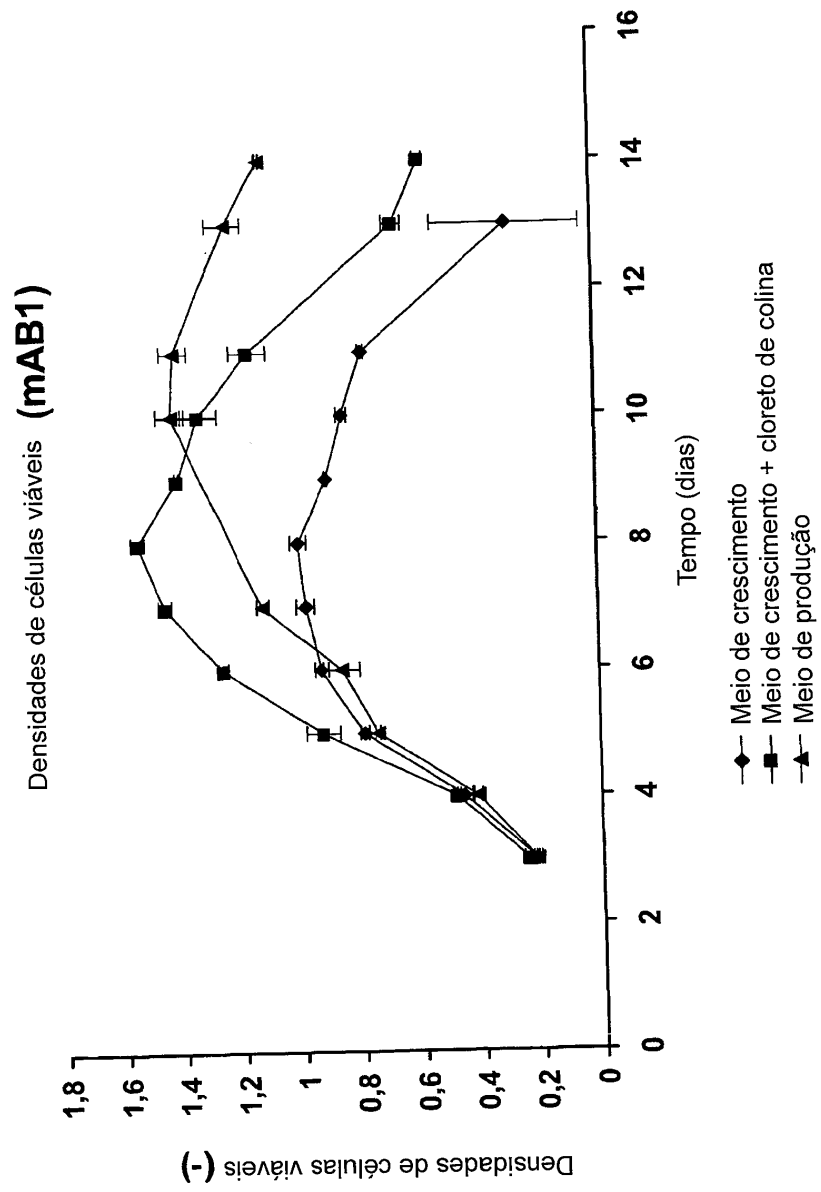


Fig. 2

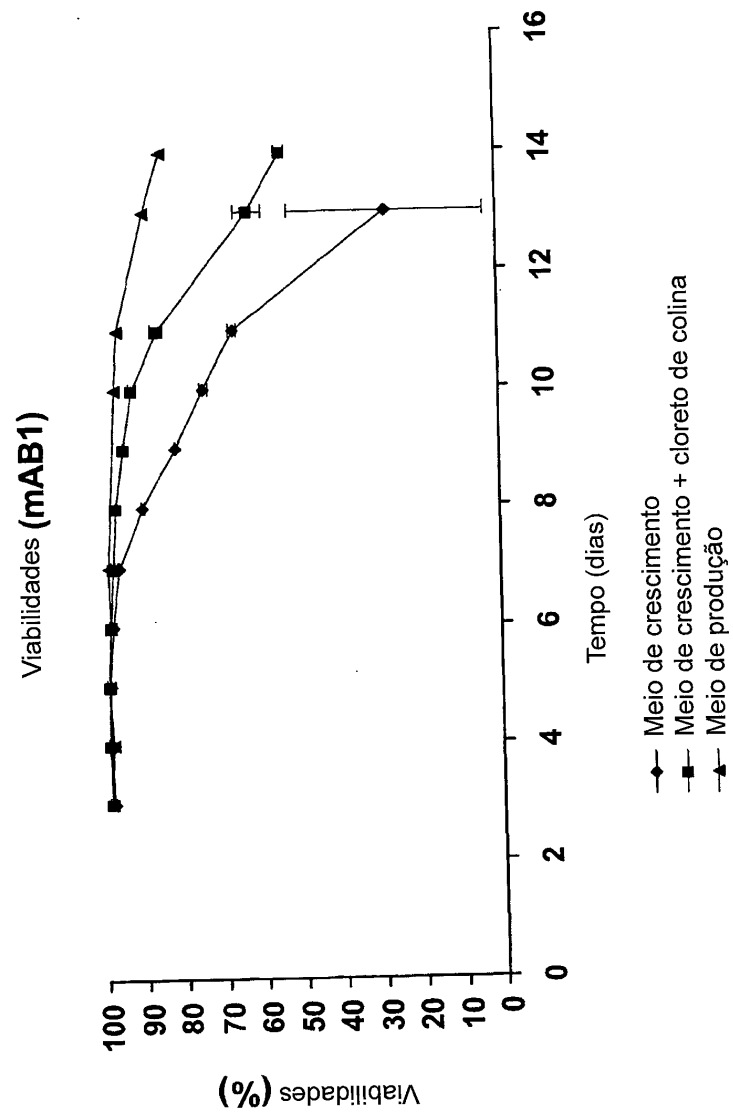


Fig. 3

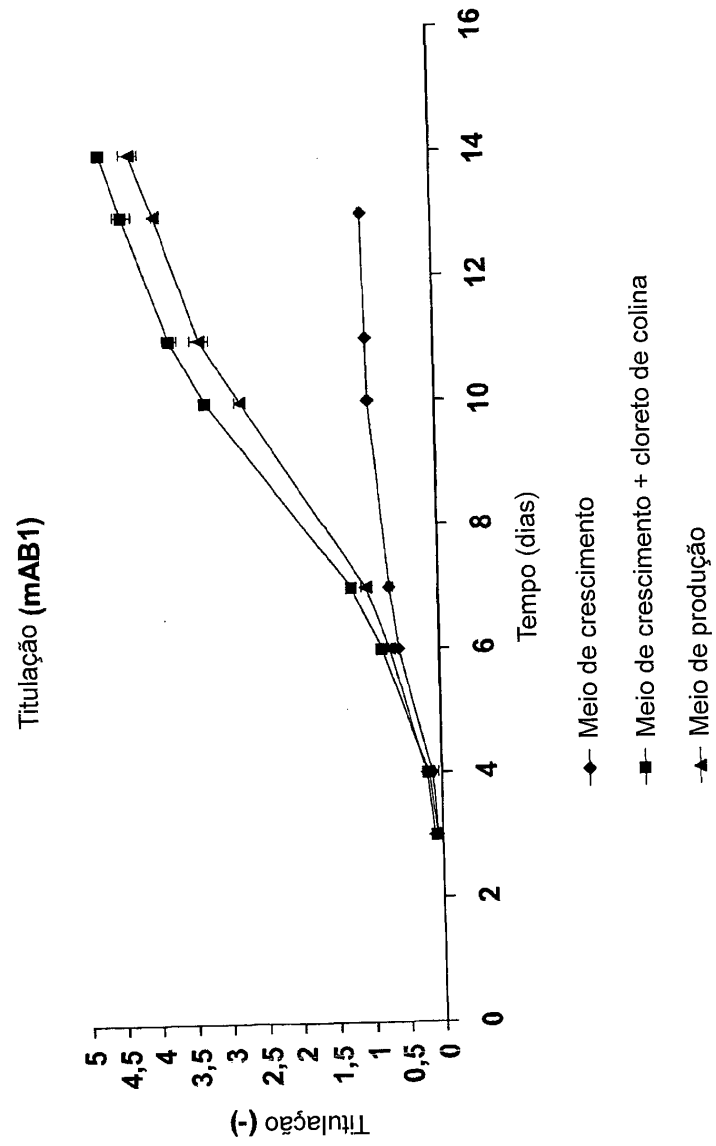


Fig. 4

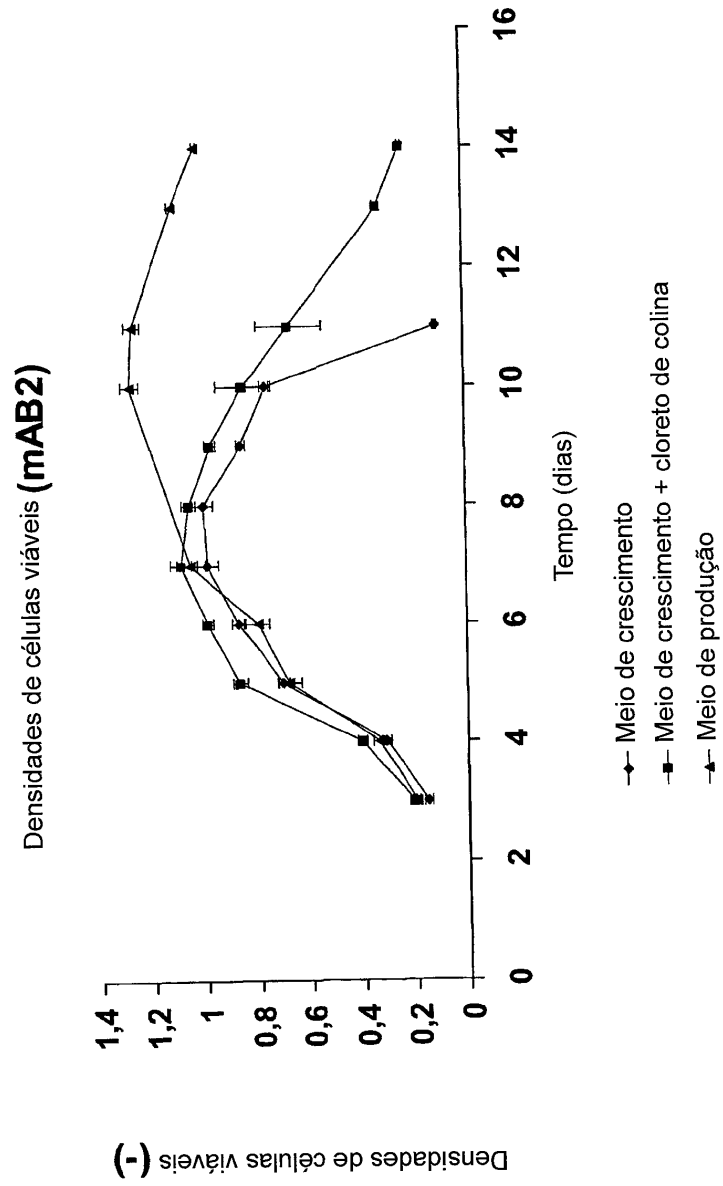


Fig. 5

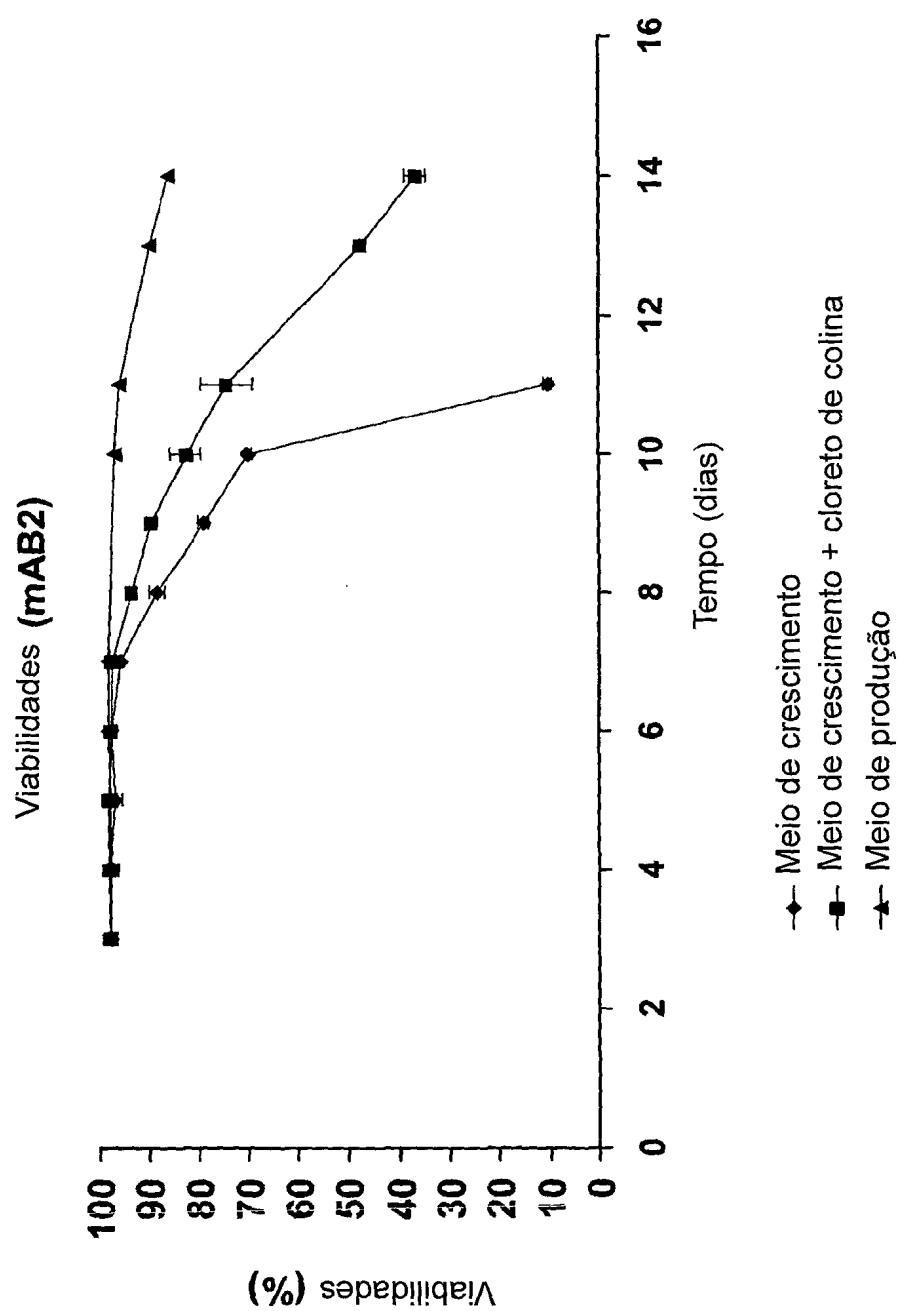


Fig. 6

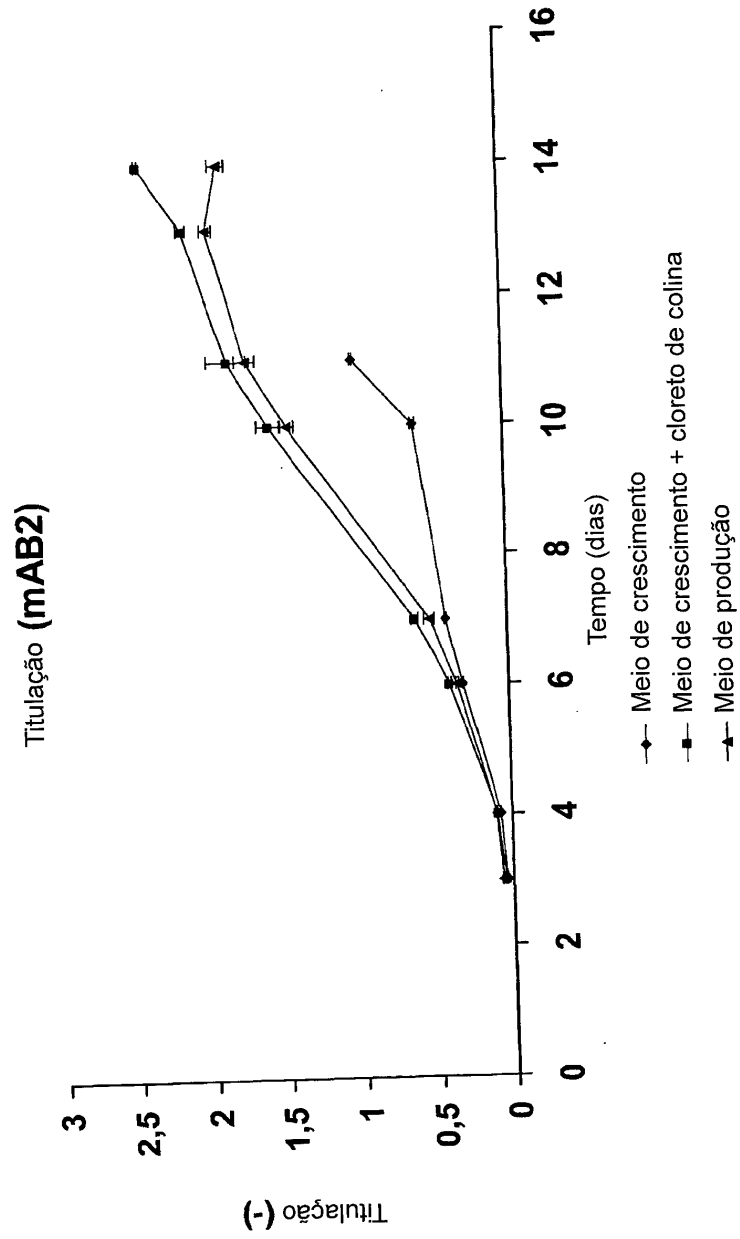


Fig. 7

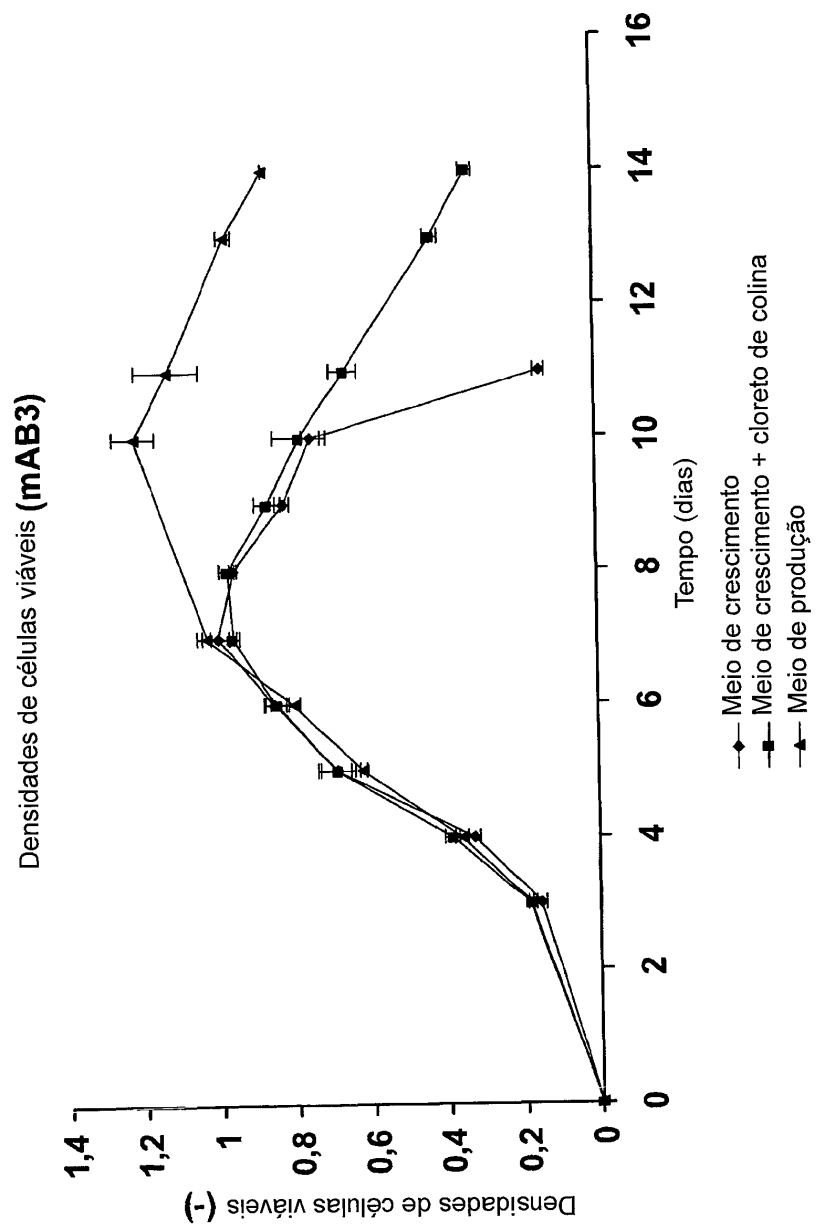
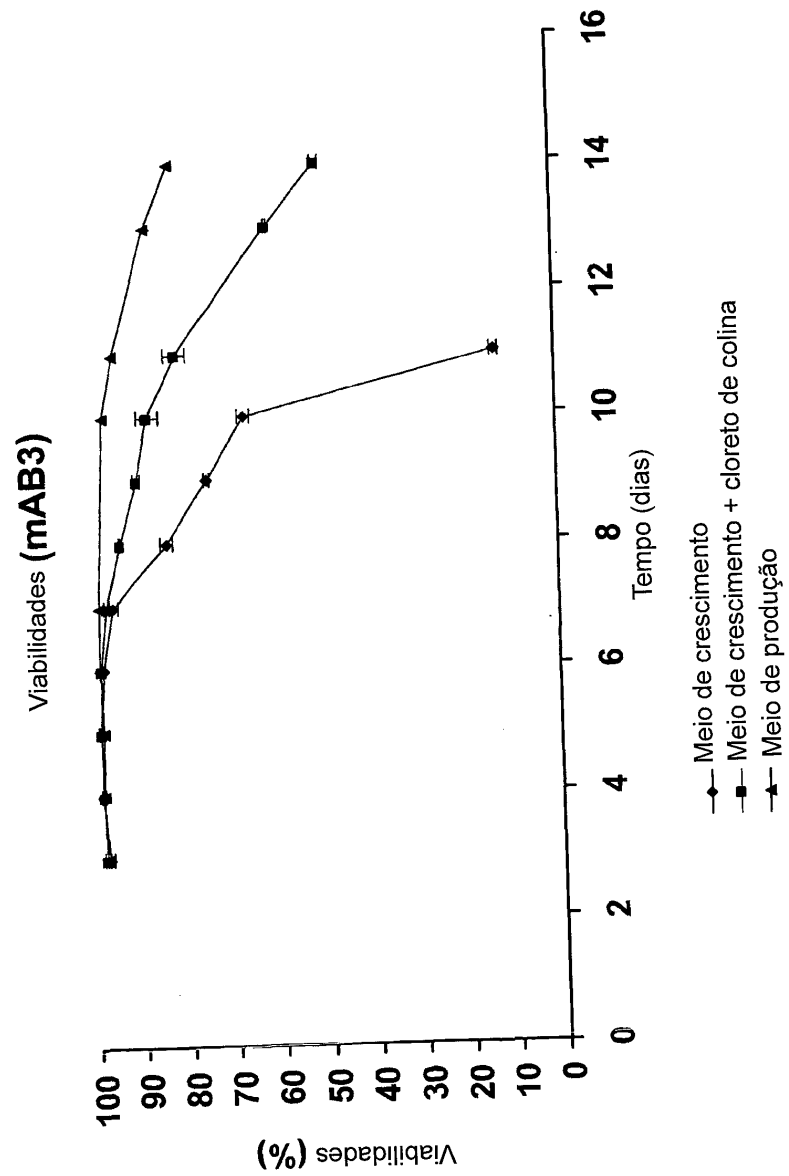




Fig. 8



9/24

Fig. 9

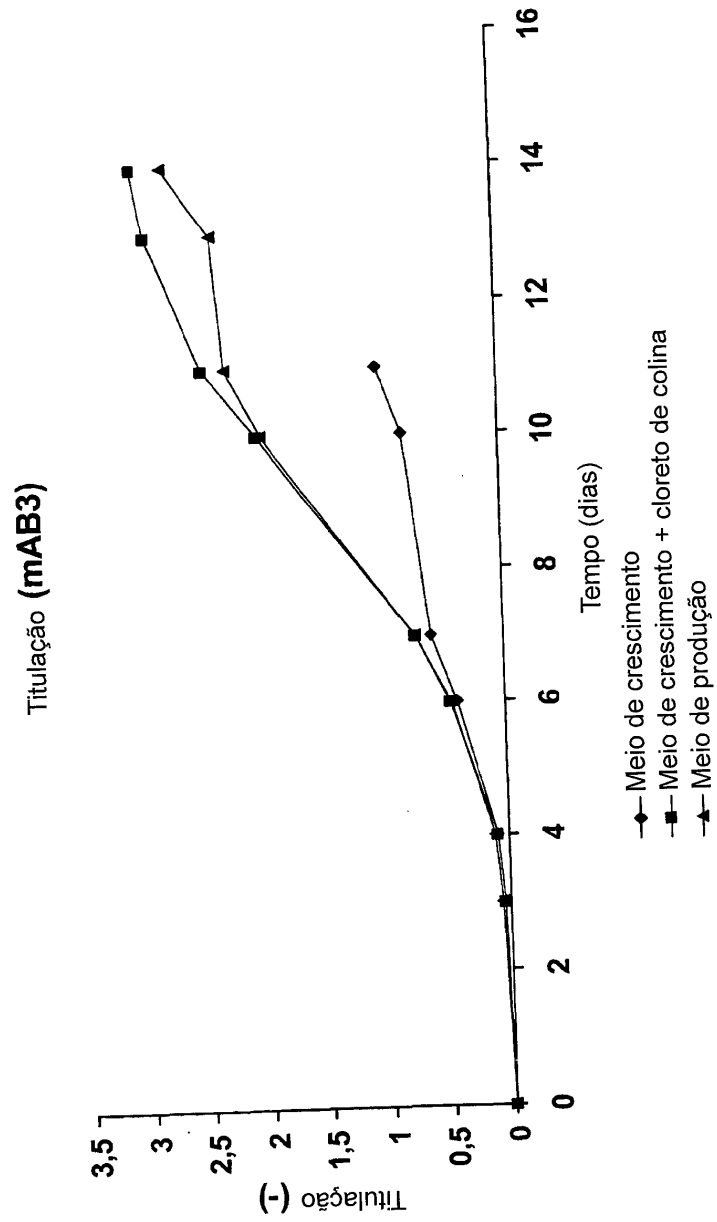


Fig. 10

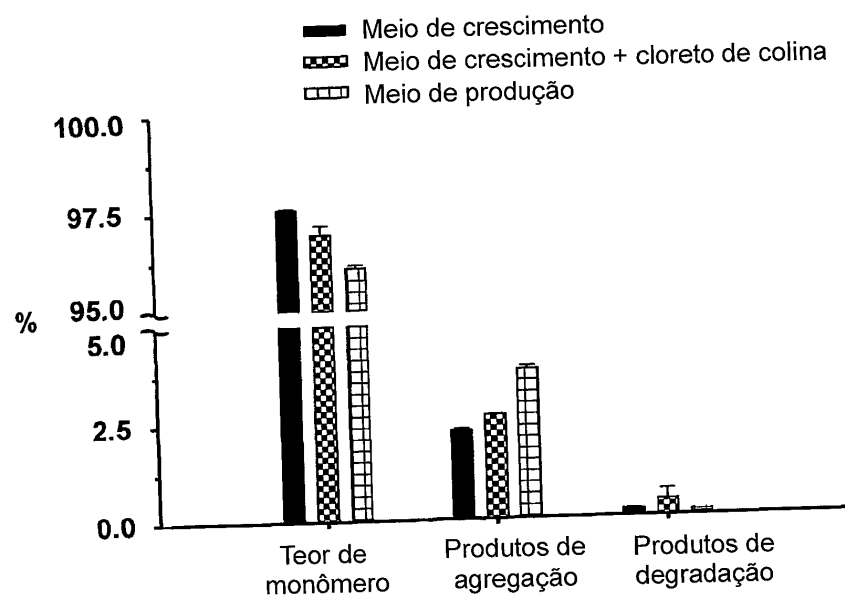


Fig. 11

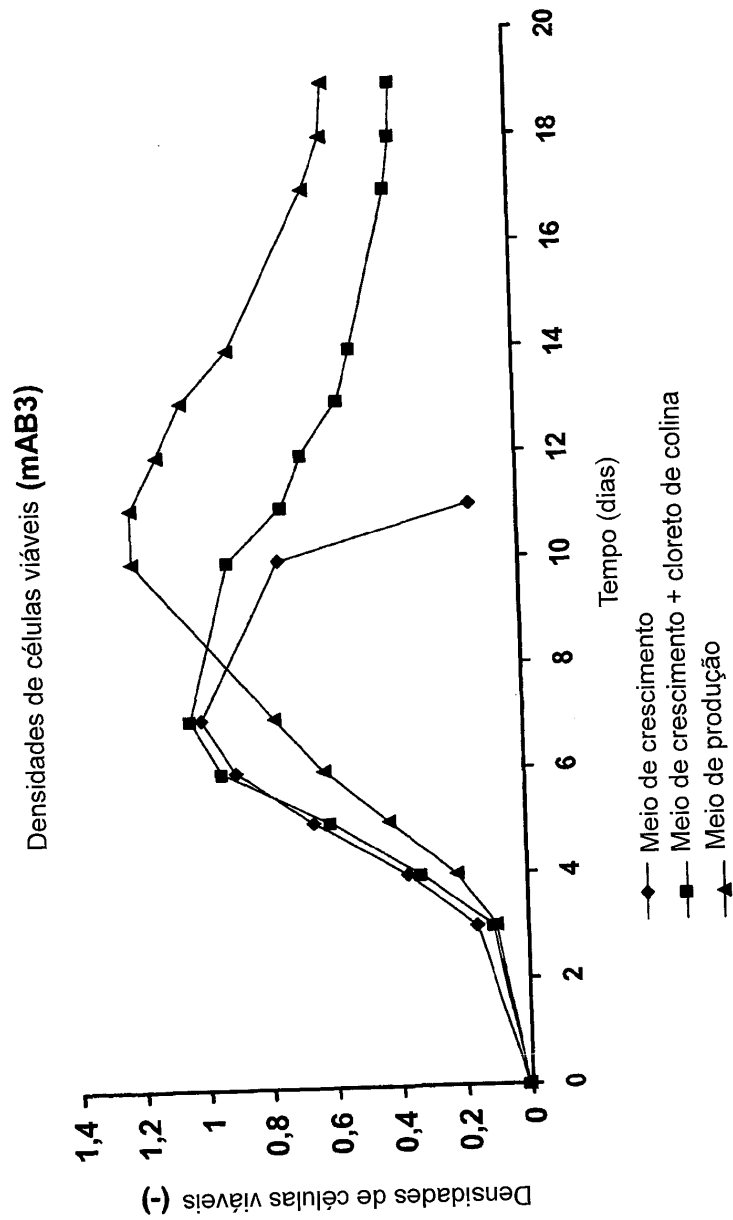


Fig. 12

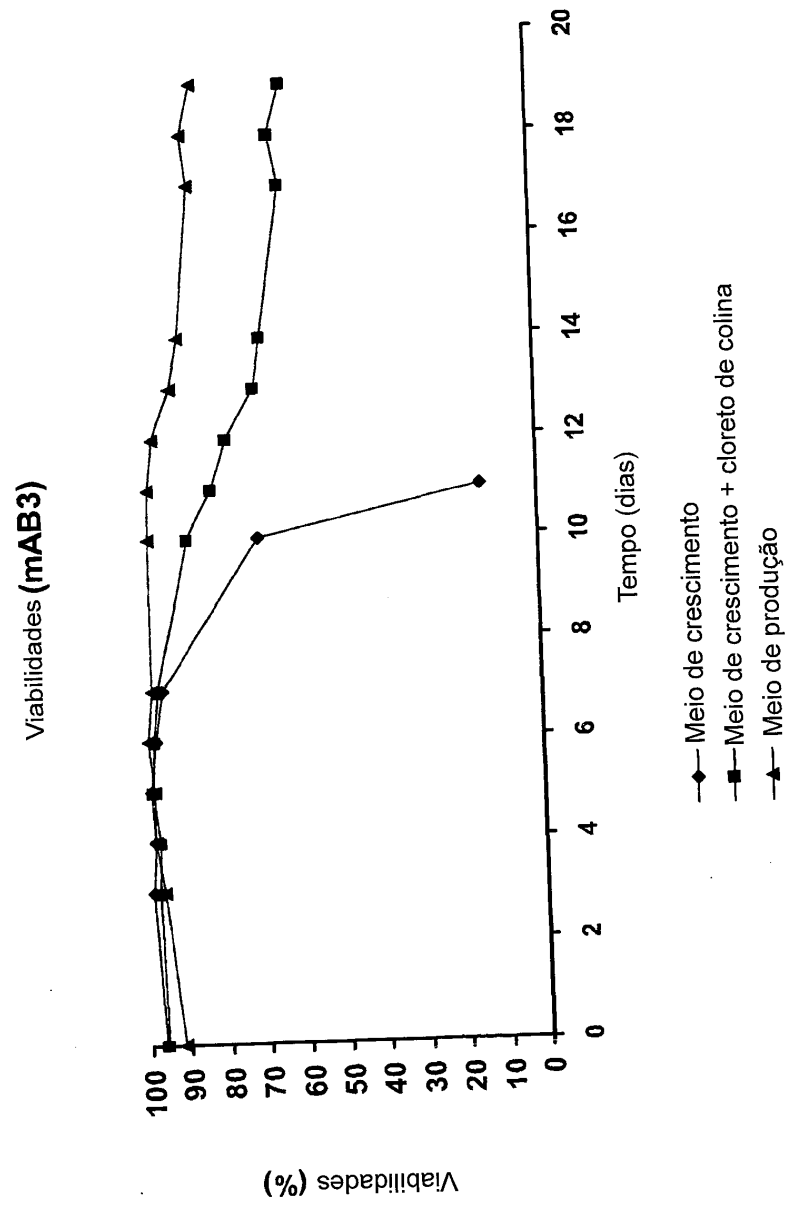


Fig. 13

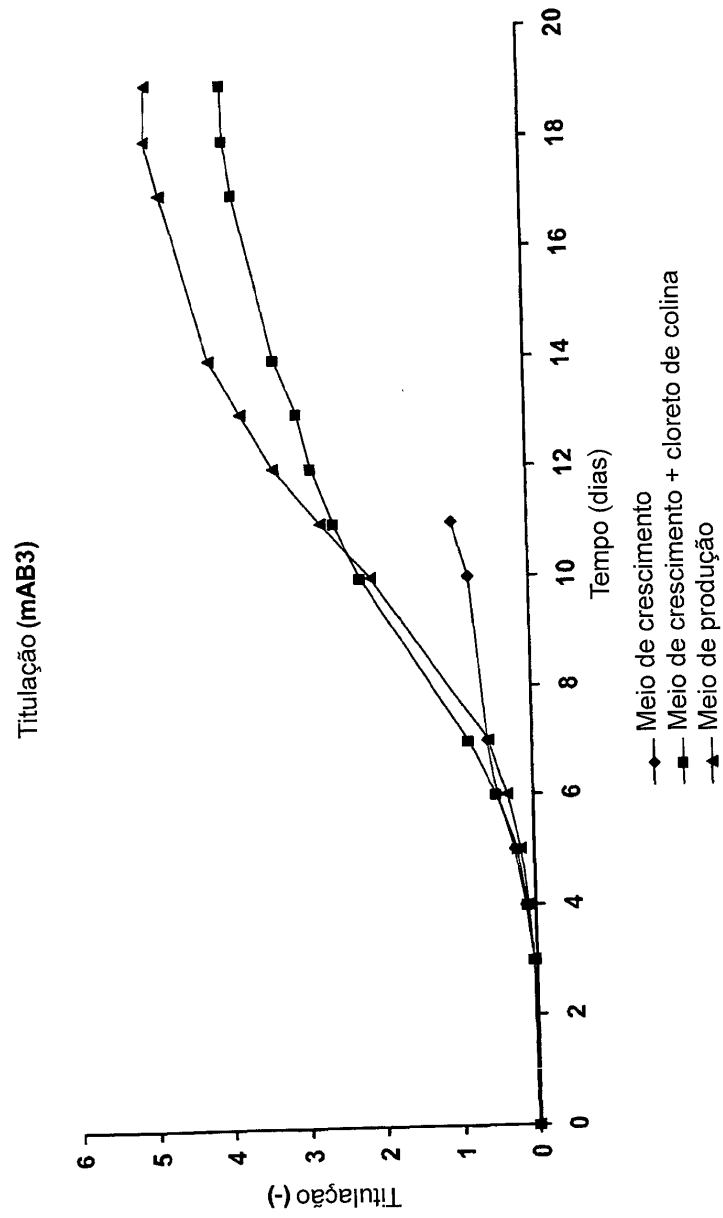


Fig. 14

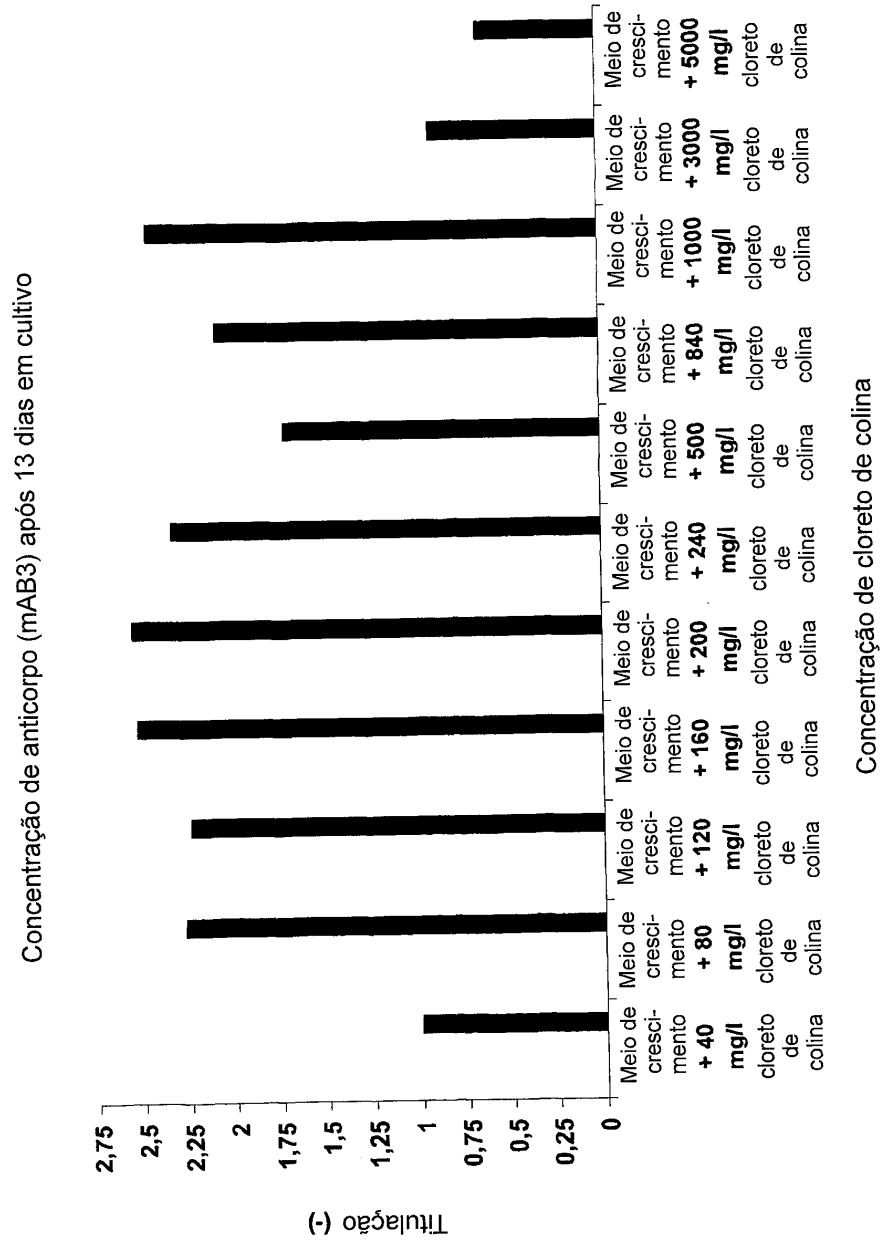
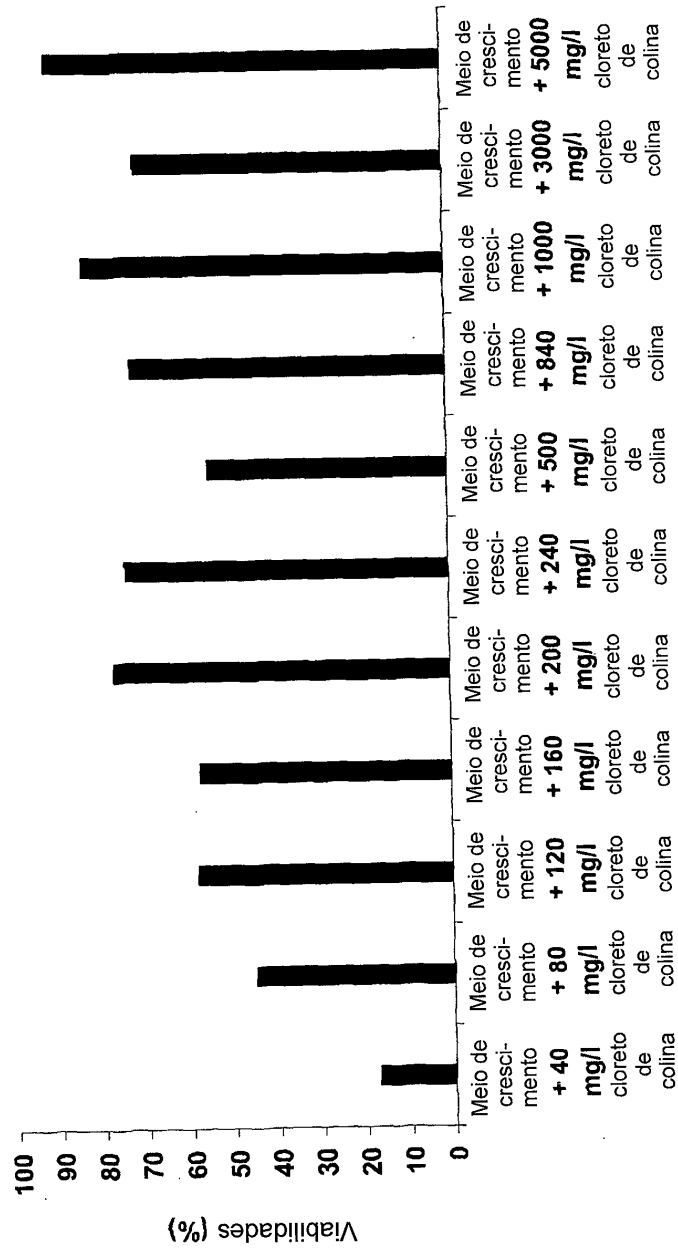


Fig. 15

Viabilidades após 13 dias em cultivo (mAB3)



Concentração de cloreto de colina



Fig. 16

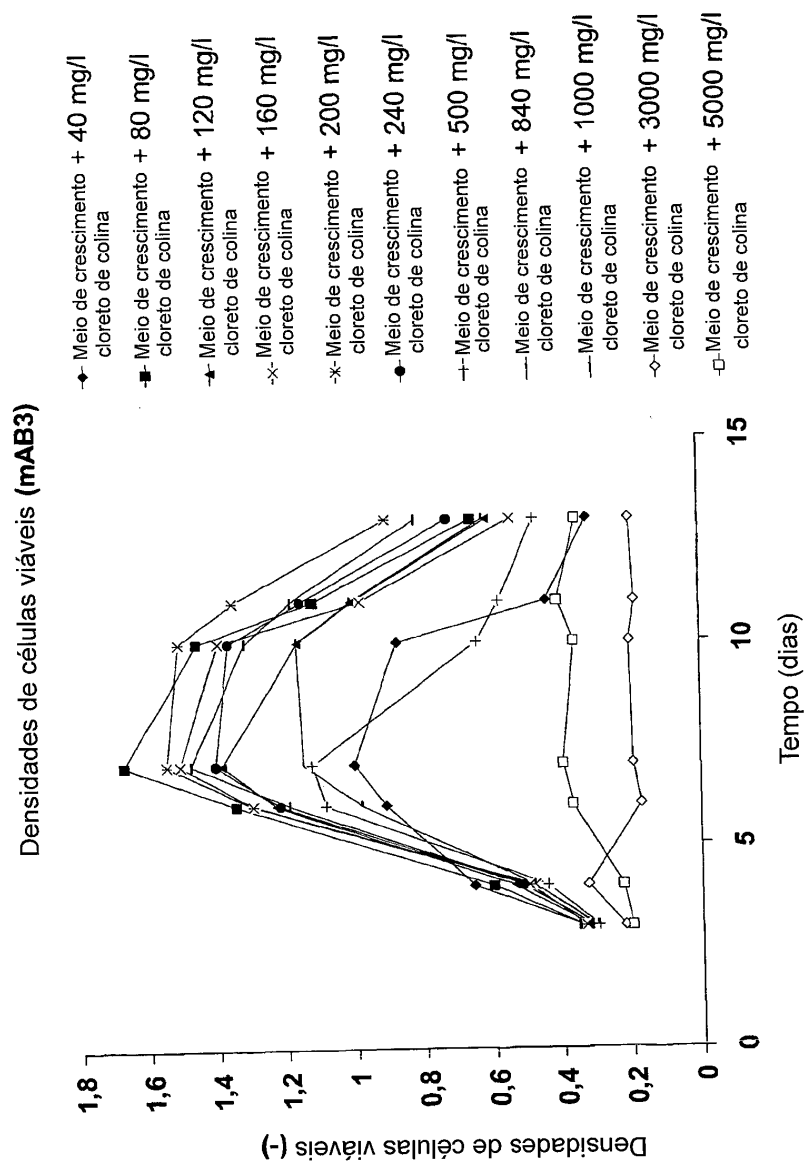
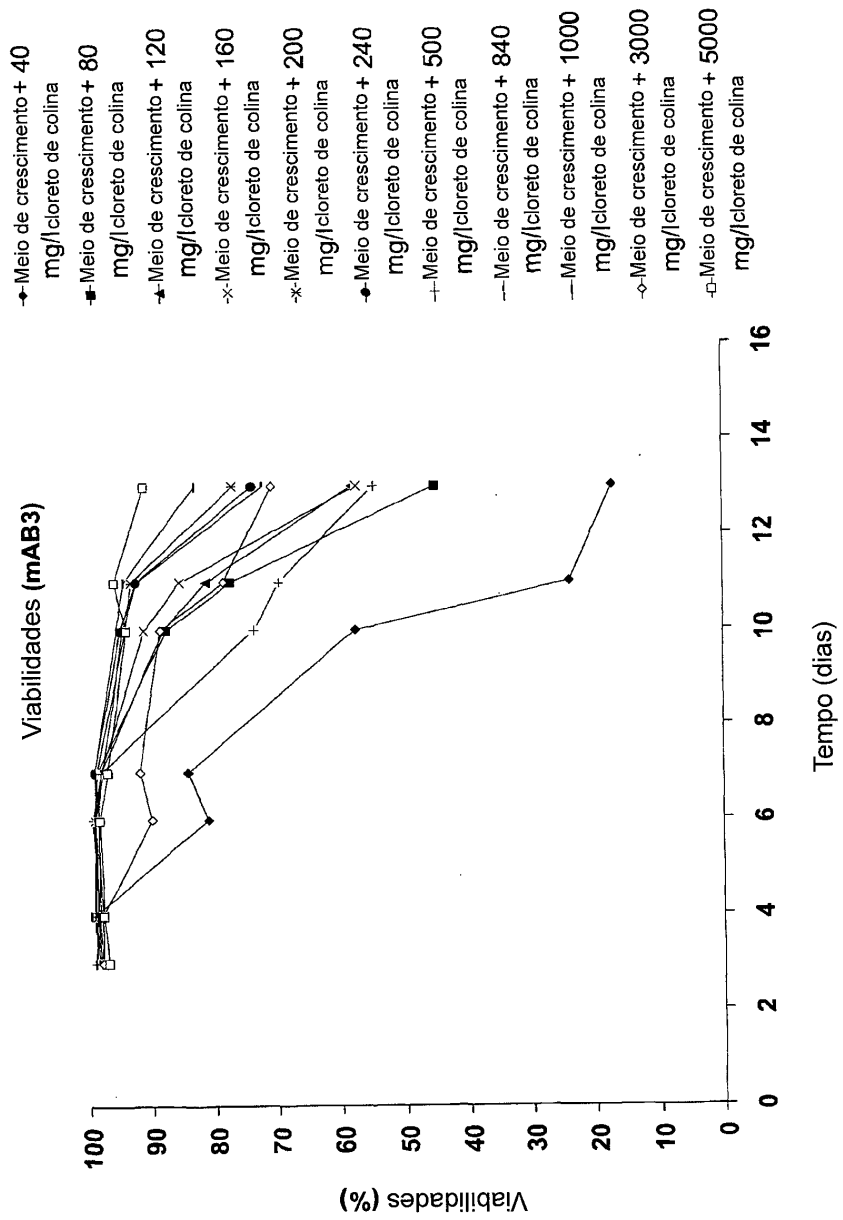


Fig. 17



•



Fig. 19

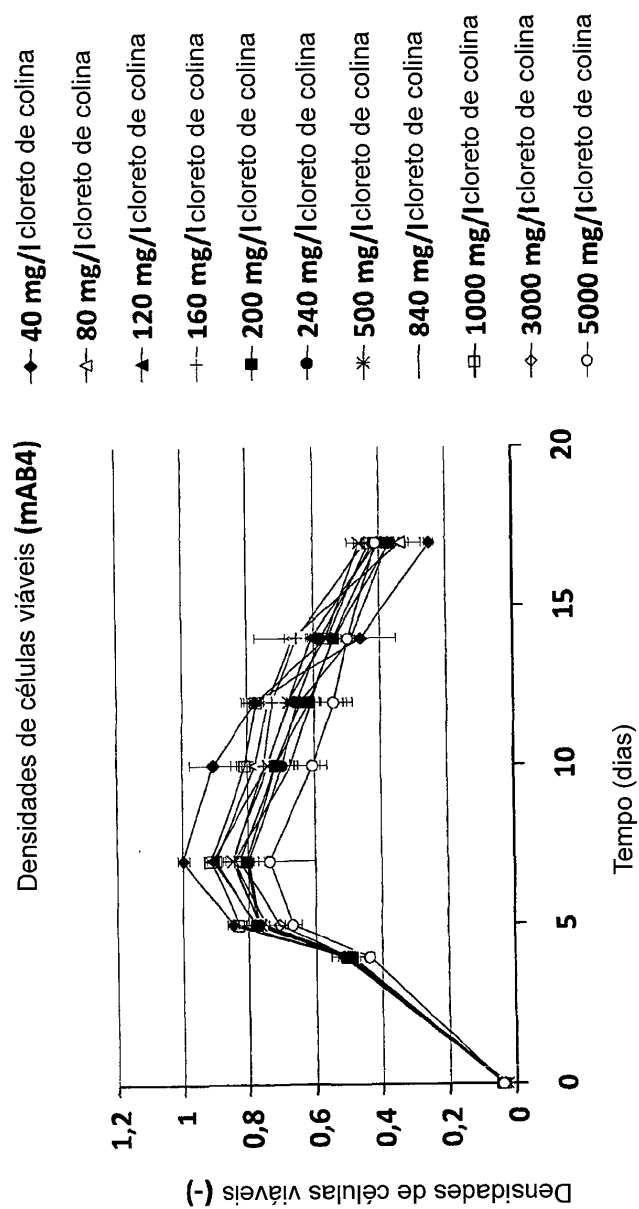


Fig. 20

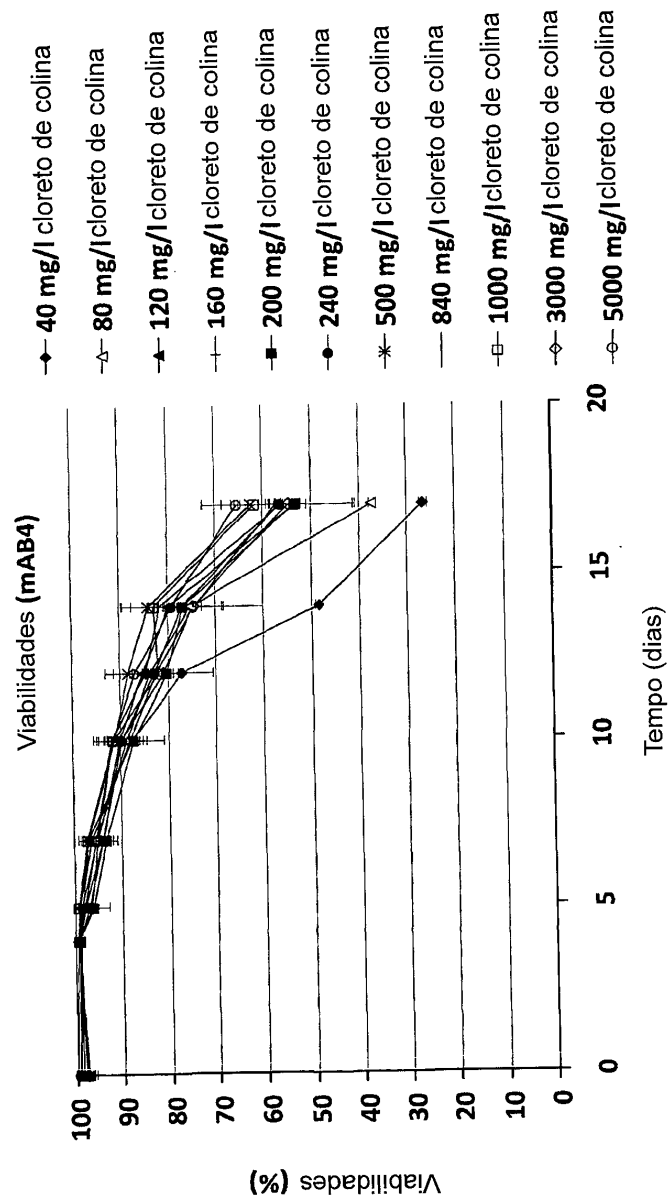


Fig. 21

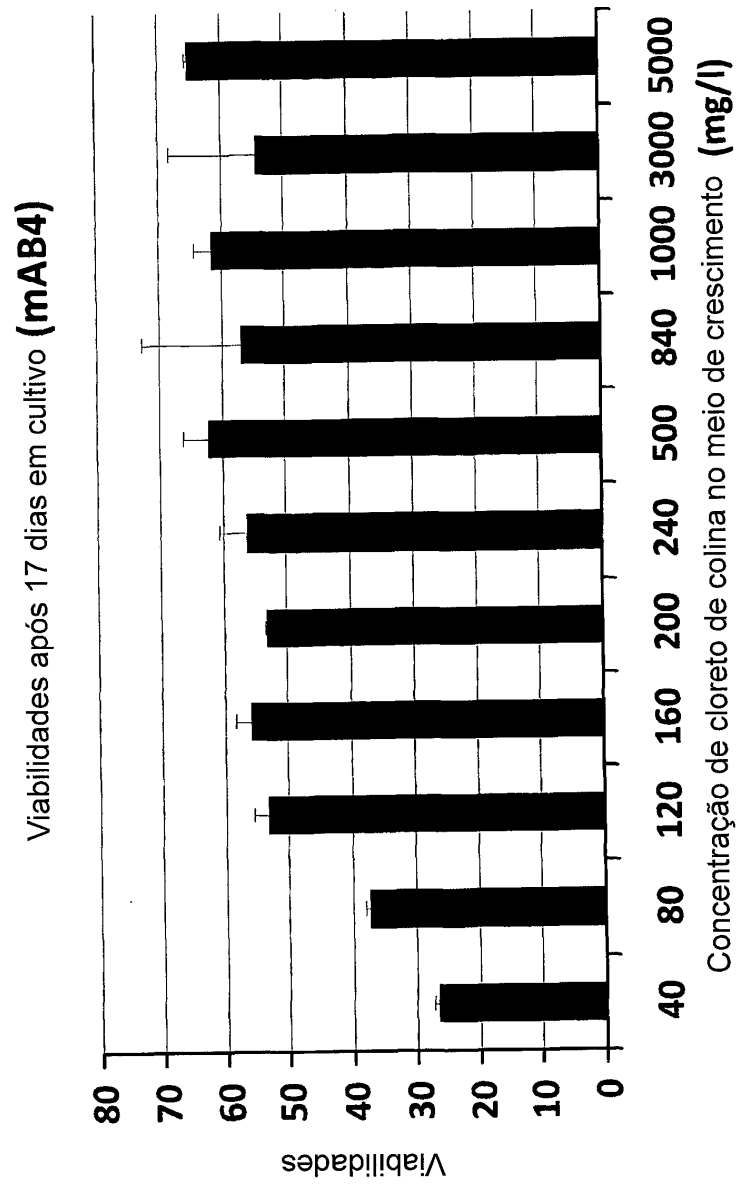


Fig. 22

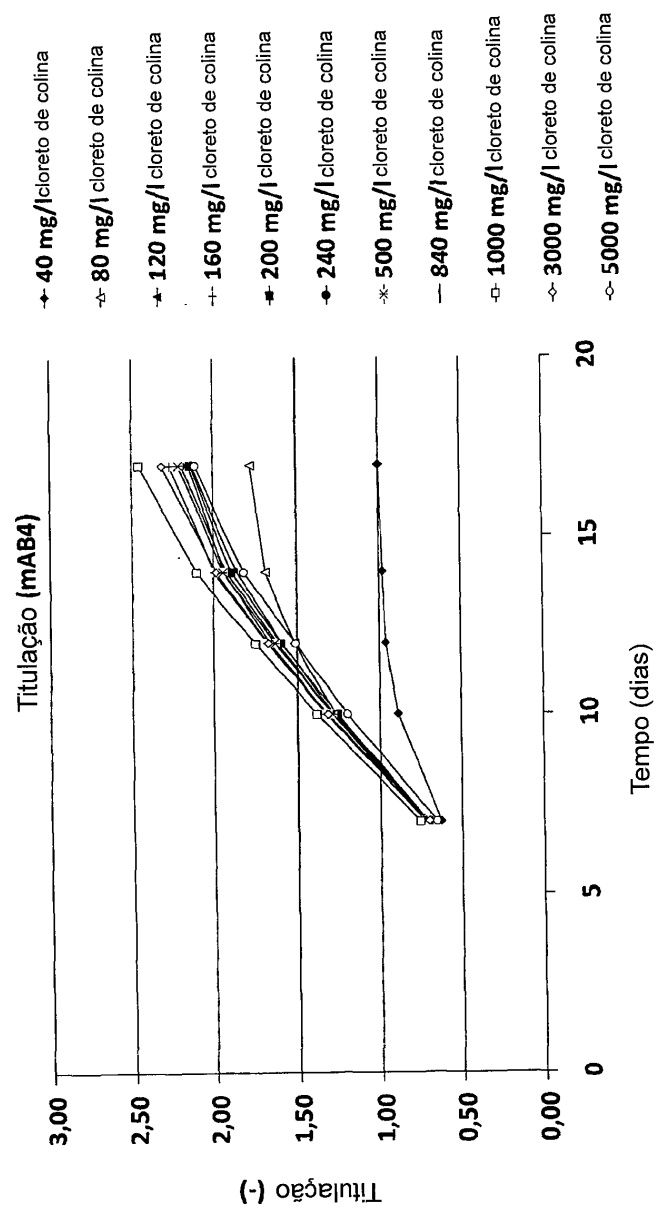


Fig. 23

