

(11) Número de Publicação: **PT 1992697 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/62 (2007.10) **C07K 14/715** (2007.10)

C12P 21/02 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2005.08.26**

(30) Prioridade(s): **2004.08.27 US 605379**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.11.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.17**
076/2010

(73) Titular(es):

WYETH RESEARCH IRELAND LIMITED
LITTLE CONNELL NEWBRIDGE KILDARE **IE**

(72) Inventor(es):

DENIS DRAPEAU **US**
YEN-TUNG LUAN **US**
WENG WANG **US**
DANIEL R. LASKO **US**
JAMES R. MERCER **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE TNFR-FC**

(57) Resumo:

RESUMO**"PRODUÇÃO DE TNFR-Fc"**

É proporcionado um sistema melhorado para a produção em grande escala de TNFR-Fc ligado em cultura celular, particularmente em meios caracterizados por um ou mais de: i) uma concentração cumulativa de aminoácidos superior a cerca de 70 mM; ii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para asparagina cumulativa inferior a cerca de 2; iii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para aminoácidos cumulativos totais inferior a cerca de 0,2; iv) uma proporção molar de ião inorgânico cumulativo para aminoácidos totais cumulativos entre cerca de 0,4 e 1; ou v) uma concentração combinada de glutamina cumulativa e asparagina cumulativa entre cerca de 16 e 36 mM. A utilização desse sistema permite a produção de níveis elevados de proteína e diminui a acumulação de certos factores indesejáveis, tais como amónio e/ou lactato. Adicionalmente, são proporcionados métodos de cultura que incluem uma mudança de temperatura, incluindo tipicamente uma diminuição da temperatura quando a cultura atingiu cerca de 20-80% da sua densidade celular máxima. Alternativamente, ou adicionalmente, a presente invenção proporciona métodos em que, após alcançar um pico, os níveis de lactato e/ou amónio na cultura diminuem ao longo do tempo.

DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO DE TNFR-Fc"

Antecedentes da Invenção

As proteínas e polipéptidos tornaram-se cada vez mais importantes como agentes terapêuticos. Na maioria dos casos, as proteínas e polipéptidos terapêuticos são produzidos em cultura celular, a partir de células que foram modificadas e/ou seleccionadas para produzir níveis anormalmente elevados da proteína ou polipéptido particular de interesse. O controlo e a optimização das condições de cultura celular são criticamente importante para a produção comercial de sucesso de proteínas e polipéptidos.

Muitas proteínas e polipéptidos produzidos em cultura celular são produzidas num processo descontínuo ou semi-contínuo, no qual as células são cultivadas durante um período de tempo, e depois a cultura é terminada e a proteína ou polipéptido produzido é isolado. A quantidade e qualidade final da proteína ou polipéptido produzido podem ser dramaticamente afectadas pelas condições da cultura celular. Por exemplo, os processos de cultura descontínua ou semi-contínua tradicionais resultam frequentemente na produção de produtos de resíduos metabólicos que possuem

efeitos prejudiciais no crescimento celular, viabilidade, e produção ou estabilidade da proteína ou polipéptido de interesse. Embora tenham sido desenvolvidos esforços para melhorar a produção de proteínas e polipéptidos em processos de cultura descontínua ou semi-contínua, permanece uma necessidade para melhoramentos adicionais.

Adicionalmente, foi investido esforço significativo no desenvolvimento de meios definidos (*i.e.*, meios constituídos a partir de componentes individuais conhecidos e sem soro ou outros subprodutos animais) para utilização na cultura de células, particularmente células de mamíferos. As características de crescimento celular podem ser muito diferentes em meios definidos como contrastado com meios derivados de soro. Existe uma necessidade particular para o desenvolvimento de sistemas melhorados para produzir proteínas e polipéptidos através de cultura celular em meios definidos.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um sistema melhorado para a produção em larga escala de proteínas e/ou polipéptidos em cultura celular. Por exemplo, a presente invenção proporciona métodos de cultura à escala comercial (*e.g.*, 500 L ou mais) que utilizam um meio caracterizado por um ou mais de: i) uma quantidade cumulativa de amino-ácidos por volume de unidade superior a cerca de 70 mM; ii)

uma proporção molar de glutamina cumulativa para asparagina cumulativa inferior a cerca de 2; iii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para aminoácidos cumulativos totais inferior a cerca de 0,2; iv) uma proporção molar de ião inorgânico cumulativo para aminoácidos cumulativos totais entre cerca de 0,4 para 1; ou v) uma concentração combinada cumulativa de glutamina e asparagina por volume de unidade superior a cerca de 16 mM. Um especialista na técnica entenderá que "cumulativo", como utilizado acima, se refere à quantidade total de um componente ou componentes particulares adicionados ao longo da cultura de células, incluindo componentes adicionados no início da cultura e componentes adicionados subsequentemente. Em certas formas de realização preferidas da invenção, é desejável minimizar "alimentações" da cultura ao longo do tempo, de modo a que seja desejável maximizar as quantidades inicialmente presentes. É claro, os componentes do meio são metabolizados durante a cultura de modo a que as culturas com as mesmas quantidades cumulativas de dados componentes possuirão níveis absolutos diferentes se esses componentes são adicionados a tempos diferentes (e.g., todos presentes inicialmente vs. alguns adicionados através de alimentações)

De acordo com a presente invenção, a utilização desse meio permite a produção de níveis elevados da produção de proteína e diminui a acumulação de certos factores indesejáveis, tais como amónio e/ou lactato.

Um especialista na técnica entenderá que as formulações dos meios da presente invenção compreendem tanto meios definidos como não definidos. Em certas formas de realização preferidas da presente invenção, o meio de cultura é um meio definido no qual a composição do meio é conhecida e controlada.

Em certas formas de realização preferidas da presente invenção, os métodos de cultura incluem mudar a cultura de um primeiro conjunto de condições de cultura para um Segundo conjunto de condições de cultura, de modo a que seja alcançado um desvio metabólico das células. Em algumas formas de realização, esta alteração é realizada quando a cultura atingiu cerca de 20-80% da sua densidade celular máxima. Em algumas formas de realização, a alteração envolve alterar a temperatura (ou gama de temperatura) na qual a cultura é mantida. Alternativamente ou adicionalmente, a presente invenção proporciona métodos ajustados de modo a que, após atingir um pico, os níveis de lactato e/ou amónio na cultura diminuam ao longo do tempo. Noutras formas de realização, o desvio envolve desviar o pH, a osmolaridade ou o nível de indutores químicos, tais como ácidos alcanóicos ou os seus sais.

As culturas celulares da presente invenção podem ser opcionalmente suplementados com nutrientes e/ou outros componentes do meio, incluindo hormonas e/ou outros

factores de crescimento, iões particulares (tais como sódio, cloro, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões, vitaminas, nucleósidos ou nucleótidos, oligoelementos (compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais muito baixas), aminoácidos, lípidos, ou glucose ou outra fonte de energia. Em certas formas de realização da presente invenção, pode ser benéfico suplementar o meio media com indutores químicos, tais como hexametilenobis (acetamida) ("HMBA") e butirato de sódio ("NaB"). Estes suplementos opcionais podem ser adicionados no início da cultura ou podem ser adicionados num momento mais tarde de modo a reabastecer nutrientes empobrecidos ou por outra razão. Em geral, é desejável seleccionar a composição do meio inicial para minimizar a suplementação de acordo com a presente invenção.

Podem ser monitorizadas várias condições de cultura de acordo com a presente invenção, incluindo pH, densidade celular, viabilidade celular, níveis de lactato, níveis de amónio, osmolaridade, ou título do polipéptido ou proteína expressos.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 apresenta uma comparação do Meio 1 e Meio 2 em frascos de agitação utilizando células anti-GDF-8.

Figura 2 apresenta o crescimento celular e a viabilidade de células anti-GDF-8 no Meio 1.

A Figura 3 apresenta o crescimento celular de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e sem alimentação de glutamina.

A Figura 4 apresenta a viabilidade celular de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e sem alimentação de glutamina.

A Figura 5 apresenta níveis de amónio de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e sem alimentação de glutamina.

A Figura 6 apresenta níveis de lactato de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e sem alimentação de glutamina.

A Figura 7 apresenta o título anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e sem alimentação de glutamina.

A Figura 8 apresenta densidade celular de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e alimentação com privação de glutamina.

A Figura 9 apresenta a viabilidade celular de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e alimentação com privação de glutamina.

A Figura 10 apresenta os níveis de amónio de

culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e com privação de glutamina.

A Figura 11 apresenta níveis de lactato de culturas celulares anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e com privação de glutamina.

A Figura 12 apresenta o título de anti-GDF-8 em condições de cultura de controlo e com privação de glutamina.

A Figura 13 apresenta a resposta a dose de ferro de células anti-GDF-8 em Meio 1 e Meio 2.

A Figura 14 apresenta densidade celular de culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 15 apresenta a viabilidade celular de culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 16 apresenta o título de Y anti-Lewis em culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 17 apresenta os níveis de lactato em cultura alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 18 apresenta os níveis de amónio em cultura alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 19 apresenta a osmolaridade de culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

A Figura 20 apresenta a densidade celular de células Y anti-Lewis. Cada gráfico é a média de dois frascos de cultura cultivados utilizando as mesmas condições.

A Figura 21 apresenta a viabilidade celular de células Y anti-Lewis. Cada gráfico é a média de dois frascos de cultura cultivados utilizando as mesmas condições.

A Figura 22 apresenta o título médio da cultura de Y anti-Lewis. Cada gráfico é a média de dois frascos de cultura cultivados utilizando as mesmas condições.

A Figura 23 apresenta os níveis de amónio de células Y anti-Lewis. Cada gráfico é a média de dois frascos de cultura cultivados utilizando as mesmas condições.

A Figura 24 apresenta salto de impulso utilizado em culturas com alimentação descontínua.

A Figura 25 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 26 apresenta a viabilidade de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 27 apresenta o título de anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 28 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 29 apresenta os níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 30 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 31 apresenta o título de anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 32 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 33 apresenta os níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais.

A Figura 34 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 35 apresenta a viabilidade celular de células anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 36 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 37 apresenta os níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 38 apresenta os níveis de glutamina de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 39 apresenta o título de anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 40 apresenta a osmolaridade de culturas de anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

A Figura 41 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 42 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 43 apresenta os níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 em meios media contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 44 apresenta os níveis de glutamina de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 45 apresenta os níveis de glutamato de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 46 apresenta o título de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 47 apresenta a osmolaridade de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

A Figura 48 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

A Figura 49 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

A Figura 50 apresenta os níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

A Figura 51 apresenta os níveis de glutamina de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

A Figura 52 apresenta o título de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

A Figura 53 apresenta crescimento celular de células anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

A Figura 54 apresenta os níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

A Figura 55 apresenta níveis de amónio de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

A Figura 56 apresenta o título de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

A Figura 57 apresenta o crescimento celular de células anti-GDF-8 em Meios 1, 3 e 9.

A Figura 58 apresenta o título de anti-GDF-8 em Meio 1, 3 e 9.

A Figura 59 apresenta os títulos de anti-GDF-8 extrapolados para vários níveis de glutamina isoladamente e glutamina e asparagina total combinadas.

A Figura 60 apresenta o crescimento celular de células anti-ABeta nas várias condições de meio testadas.

A Figura 61 apresenta a viabilidade celular de células anti-ABeta nas várias condições de meio testadas.

A Figura 62 apresenta níveis de lactato de culturas anti-ABeta nas várias condições de meio testadas.

A Figura 63 apresenta os níveis de amônio de culturas anti-ABeta nas várias condições de meio testadas.

A Figura 64 apresenta o título anti-ABeta nas várias condições de meios testadas.

A Figura 65 apresenta a osmolaridade de culturas anti-ABeta nas várias condições de meio testadas.

A Figura 66 apresenta o crescimento celular de células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 67 apresenta a viabilidade das células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 68 apresenta a glucose residual em culturas de células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 69 apresenta os níveis de glutamina em culturas de células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 70 apresenta a concentração de lactato em culturas de células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 71 apresenta os níveis de amónio em culturas de células que expressam TNFR-Ig em várias condições experimentais.

A Figura 72 apresenta TNFR-Ig relativa a título em várias condições experimentais.

A Figura 73 apresenta as densidades celulares de células anti-GDF-8 cultivadas em biorreactores de 6000 L e de 1 L.

A Figura 74 apresenta os títulos de células anti-GDF-8 cultivadas em biorreactores de 6000 L e de 1 L.

A Figura 75 apresenta os níveis de lactato de células anti-GDF-8 cultivadas em biorreactores de 6000 L e de 1 L.

A Figura 76 apresenta os níveis de amónio de células anti-GDF-8 cultivadas em biorreactores de 6000 L e de 1 L.

Definições

"Cerca de", "Aproximadamente": Como aqui utilizados, os termos "cerca de" e "aproximadamente", conforme aplicados a uma ou mais condições de cultura particulares, referem-se a uma gama de valores que são semelhantes ao valor de referência estabelecido para essa condição ou condições de cultura. Em certas formas de realização, o termo "cerca de" refere-se a uma gama de valores que se situa dentro de 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 por cento ou menos do valor de referência estabelecido para essa condição ou condições de cultura.

"Aminoácido": O termo "aminoácido", como aqui utilizado, refere-se a qualquer um dos vinte aminoácidos que ocorrem naturalmente, que são normalmente utilizados na formação de polipéptidos, ou análogos ou derivados desses aminoácidos. Os aminoácidos da presente invenção são proporcionados no meio para culturas celulares. Os

aminoácidos proporcionados no meio podem ser fornecidos como sais ou na forma de hidrato.

"Anticorpo": O termo "anticorpo", como aqui utilizado, refere-se a uma molécula de imunoglobulina ou uma porção imunologicamente activa de uma molécula de imunoglobulina, tal como um fragmento Fab ou $F(ab')_2$, que contém um ou mais sítios de ligação ao antigénio que se ligam especificamente (imunorreagem com) um antigénio. Os termos "anticorpos monoclonais" e "composição de anticorpo monoclonal", como aqui utilizados, referem-se a uma população clonal de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie de um sítio de ligação ao antigénio capaz de imunorreagir com um epitopo particular de um antigénio, enquanto que os termos "anticorpos policlonais" e "composição de anticorpo policlonal" refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém múltiplas espécies de sítios de ligação ao antigénio capazes de interagir com um antigénio particular. A definição de anticorpos monoclonais inclui tanto moléculas clonais derivadas por tecnologias tradicionais como por moléculas de sequência definida derivadas por manipulação ou mutação de resíduos específicos, por exemplo, anticorpos humanizados.

"Cultura descontínua": O termo "cultura descontínua", como aqui utilizado refere-se a um método de cultura de células no qual todos os componentes que serão no final utilizados na cultura das células, incluindo o

meio (ver definição de "meio" abaixo) assim como as próprias células, são fornecidos no início do processo de cultura. Uma cultura descontínua é tipicamente parada em algum ponto e as células e/ou componentes no meios são recolhidos e opcionalmente purificados.

"Biorreactor": O termo "biorreactor", como aqui utilizado, refere-se a qualquer frasco utilizado para o crescimento de uma cultura celular de mamíferos. O biorreactor pode ser de qualquer tamanho, desde que seja útil para a cultura de células de mamíferos. Tipicamente, o biorreactor será pelo menos de 1 litro e pode ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 litros ou mais, ou qualquer volume entre eles. As condições internas do biorreactor, incluindo, mas não limitadas ao pH e temperatura, são tipicamente controladas durante o período da cultura. O biorreactor pode ser composto por qualquer material que é adequado para manter culturas celulares de mamíferos suspensas em meios nas condições de cultura da presente invenção, incluindo vidro, plástico ou metal. O termo "biorreactor de produção", como aqui utilizado refere-se ao biorreactor final utilizado na produção do polipéptido ou proteína de interesse. O volume do biorreactor de produção de cultura celular em grande escala é tipicamente de pelo menos 500 litros e pode ser de 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 litros ou mais, ou qualquer volume entre eles. Um especialista na técnica estará ciente de, e será capaz de escolher biorreactores adequados para utilização na prática da presente invenção.

"Densidade celular": O termo "densidade celular", como aqui utilizado, refere-se ao número de células presentes num dado volume de meio.

"Viabilidade celular": O termo "viabilidade celular", como aqui utilizado, refere-se à capacidade das células em cultura para sobreviver num dado conjunto de condições de cultura ou variações experimentais. O termo como aqui utilizado também se refere à porção de células que estão vivas num momento particular em relação ao número de células total, vivas e mortas, na cultura nesse momento.

"Cultura", "Cultura celular" e "Cultura de células de mamíferos": Estes termos, como aqui utilizados, referem-se a uma população de células de mamíferos que é suspensa num meio (ver definição de "meio" abaixo) em condições adequadas para sobrevivência e/ou crescimento da população celular. Como será óbvio para um especialista na técnica, estes termos, como aqui utilizados, podem referir-se à combinação compreendendo a população de células de mamíferos e o meio no qual a população é suspensa.

"Cultura de alimentação descontínua": O termo "cultura de alimentação descontínua", como aqui utilizado, refere-se a um método de cultura de células em que os componentes adicionais são fornecidos à cultura num dado momento subsequente ao início do processo de cultura. Os componentes fornecidos compreendem tipicamente suplementos

nutricionais às células que tinham sido empobrecidos durante o processo de cultura. Uma cultura de alimentação descontínua é tipicamente parada a dado momento e as células e/ou componentes no meio são recolhidos e opcionalmente purificados.

"Fragmento": O termo "fragmento", como aqui utilizado, refere-se a polipéptidos e é definido como qualquer porção discreta de um dado polipéptido que é único para, ou característico desse polipéptido. O termo como aqui utilizado também se refere a qualquer porção discreta de um dado polipéptido que retém pelo menos uma fracção da actividade do polipéptido de comprimento total. Preferencialmente, a fracção da actividade retida é de pelo menos 10% da actividade do polipéptido de comprimento total. Mais preferencialmente, a fracção da actividade retida é pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% da actividade do polipéptido de comprimento total. Ainda mais preferencialmente, a fracção de actividade retida é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da actividade do polipéptido de comprimento total. Mais preferencialmente, a fracção de actividade retida é 100% da actividade do polipéptido de comprimento total. O termo como aqui utilizado também se refere a qualquer porção de um dado polipéptido que inclui pelo menos um elemento da sequência estabelecido encontrado no polipéptido de comprimento total. Preferencialmente, o elemento da sequência estende-se em pelo menos 4-5, mais preferencialmente pelo menos cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais aminoácidos do polipéptido de comprimento total.

"Gene": O termo "gene", como aqui utilizado refere-se a qualquer sequência de nucleótidos, DNA ou RNA, pelo menos alguma porção da qual codifica para um produto final discreto, tipicamente, mas não limitado a, um polipéptido, que funciona em algum aspecto do metabolismo ou desenvolvimento celular. O termo não pretende referir-se apenas à sequência codificante que codifica o polipéptido ou outro produto discreto final, mas também pode abranger as regiões anteriores e posteriores à sequência codificante que modula o nível de expressão basal (ver definição de "elemento de controlo genético" abaixo), assim como as sequências intervenientes ("intrões") entre segmentos codificantes individuais ("exões").

"Elemento de controlo genético": O termo "elemento de controlo genético", como aqui utilizado refere-se a qualquer elemento de sequência que modula a expressão de um gene ao qual está ligado operacionalmente. Os elementos de controlo genético podem funcionar quer aumentando ou diminuindo os níveis de expressão e podem estar localizados antes, no meio ou após a sequência codificante. Os elementos de controlo genético podem actuar em qualquer estágio da expressão genética através da regulação, por exemplo, iniciação, alongação ou terminação da transcrição, excisão do mRNA, edição de mRNA, estabilidade de mRNA, localização do mRNA na célula, iniciação, alongação ou terminação da tradução, ou qualquer outro estágio da expressão genética. Os elementos de controlo

genético podem funcionar individualmente ou em combinação um com o outro.

"Hibridoma": O termo "hibridoma", como aqui utilizado, refere-se a uma célula criada por fusão de uma célula imortalizada derivada de uma fonte imunológica e uma célula produtora de anticorpo. O hibridoma resultante é uma célula imortalizada que produz anticorpos. As células individuais utilizadas para criar o hibridoma podem ser de qualquer fonte de mamífero, incluindo, mas não limitadas a, rato, porco, coelho, ovelha, porco, cabra, e humano. O termo também engloba linhas celulares de trioma, que resultam quando a progénie de fusões de mieloma hetero-híbridas, que são o produto de uma fusão entre células humanas e uma linha celular de mieloma de murino, são subsequentemente fundidas com uma célula plasmática. Para além disso, o termo pretende incluir qualquer linha celular híbrida imortalizada que produz anticorpos tais como, por exemplo, quadromas (Ver, e.g., Milstein et al., *Nature*, 537:3053(1983)).

"Densidade Celular Viável Integrada": O termo "densidade celular viável integrada", como aqui utilizado refere-se à densidade média de células viáveis ao longo da cultura multiplicada pela quantidade de tempo a que a cultura foi mantida. Assumindo que a quantidade de polipéptido e/ou proteína produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes ao longo da cultura, a densidade celular viável integrada é uma ferramenta útil

para estimar a quantidade de polipéptido e/ou proteína produzida ao longo da cultura.

"Meio", "Meio de cultura celular", "Meio de cultura": Estes termos, como aqui utilizados, referem-se a uma solução contendo nutrientes que nutrem as células de mamíferos em desenvolvimento. Tipicamente, estas soluções fornecem aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, fontes de energia, lípidos, e oligoelementos necessários para o crescimento mínimo e/ou sobrevivência da célula. A solução pode também conter componentes que aumentam o crescimento e/ou sobrevivência acima da taxa mínima, incluindo hormonas e factores de crescimento. A solução é preferencialmente formulada para um pH e concentração de sais óptima para a sobrevivência e proliferação celular. O meio pode ser também um "meio definido" - um meio sem soro que não contém proteínas, hidrolisados ou componentes de composição desconhecida. Os meios definidos são isentos de componentes de origem animal e todos os componentes possuem uma estrutura química conhecida.

"Produto de resíduo metabólico": O termo "produto de resíduo metabólico", como aqui utilizado, refere-se a compostos produzidos pela cultura celular como um resultado de processos metabólicos normais ou não normais que são, de algum modo, prejudiciais para a cultura celular, particularmente em relação à expressão ou actividade de um polipéptido ou proteína recombinante desejado. Por exemplo,

os produtos de resíduo metabólico podem ser prejudiciais para o crescimento ou viabilidade da cultura celular, podem diminuir a quantidade de polipéptido ou proteína recombinante produzido, podem alterar a dobragem, estabilidade, glicosilação ou outra modificação pós-tradução do polipéptido ou proteína expressos, ou podem ser prejudiciais para as células e/ou expressão ou actividade do polipéptido ou proteína recombinante em qualquer número de outros modos. Produtos de resíduo metabólico exemplares incluem lactato, que é produzido como um resultado do metabolismo da glucose, e amónio, que é produzido com um resultado do metabolismo de glutamina. Um objective da presente invenção é atrasar a produção de, reduzir ou mesmo eliminar os produtos de resíduo metabólico em culturas celulares de mamífero.

"Osmolaridade" e "Osmolalidade": "Osmolalidade" é uma medida da pressão osmótica de partículas de soluto dissolvidas em solução aquosa. As partículas de soluto incluem ambos iões e moléculas não ionizadas. A osmolalidade é expressa como a concentração de partículas osmoticamente activas (*i.e.*, osmoles) dissolvidas em 1 kg de solução (1 mOsm/kg H₂O a 38°C é equivalente a uma pressão osmótica de 19 mm Hg). "Osmolaridade," por contraste, refere-se ao número de partículas de soluto dissolvidas em 1 litro de solução. Quando aqui utilizada, a abreviatura "mOsm" significa "miliosmoles/kg de solução".

"Cultura de perfusão": O termo "cultura de

perfusão", como aqui utilizado refere-se a um método de cultura de células em que os componentes adicionais são proporcionados continuamente ou semi-continuamente à cultura subsequentemente ao início do processo de cultura. Os componentes proporcionados compreendem tipicamente suplementos nutricionais às células que foram empobrecidas durante o processo de cultura. Uma porção das células e/ou componentes no meio são tipicamente recolhidas numa base contínua ou semi-contínua e são opcionalmente purificadas.

"Polipéptido": O termo "polipéptido", como aqui utilizado refere-se à cadeia sequencial de aminoácidos ligados uns aos outros através de ligações peptídicas. O termo é utilizado para se referir a uma cadeia de aminoácidos de qualquer comprimento, mas um especialista na técnica entenderá que o termo não está limitado a cadeias muito compridas e pode referir-se a uma cadeia mínima compreendendo dois aminoácidos ligados em conjunto através de uma ligação peptídica.

"Proteína": O termo "proteína", como aqui utilizado refere-se a um ou mais polipéptidos que funcionam como uma unidade discreta. Se um polipéptido único é a unidade de funcionamento discreta e não necessita de associação física permanente com outros polipéptidos de modo a formar a unidade de funcionamento discreta, os termos "polipéptido" e "proteína" como aqui utilizado são utilizados indiferentemente. Se a unidade funcional discreta for compreendida por mais do que um polipéptido que se associam fisicamente um com o outro, o termo "proteína", como aqui

utilizado refere-se aos múltiplos polipéptidos que são fisicamente acoplados e funcionam juntamente como a unidade discreta.

"Polipéptido expresso de forma recombinante" e "Polipéptido recombinante": Estes termos, como aqui utilizados, referem-se a um polipéptido expresso a partir de uma célula hospedeira de mamífero, que foi modificado geneticamente para expressar esse polipéptido. O polipéptido expresso de forma recombinante pode ser idêntico ou semelhante aos polipéptidos que são normalmente expressos na célula hospedeira de mamífero. O polipéptido expresso de forma recombinante pode ser estranho para a célula hospedeira, *i.e.* heterólogo em relação aos péptidos normalmente expressos na célula hospedeira de mamíferos. Alternativamente, o polipéptido expresso de forma recombinante pode ser quimérico nas porções do polipéptido que contêm sequências de aminoácidos que são idênticas ou semelhantes aos polipéptidos normalmente expressos na célula hospedeira de mamíferos, enquanto que outras porções são estranhas para a célula hospedeira.

"Semear": O termo "semear", como aqui utilizado, refere-se ao processo de proporcionar uma cultura celular a outro frasco de biorreactor. As células podem ter sido propagadas previamente noutro biorreactor ou frasco. Alternativamente, as células podem ter sido congeladas e descongeladas imediatamente antes de as distribuir para o biorreactor ou frasco. O termo refere-se a qualquer número de células, incluindo uma célula única.

"Título": O termo "título", como aqui utilizado refere-se à quantidade total de polipéptido expresso de forma recombinante ou proteína produzida por uma cultura celular de mamíferos dividida por uma dada quantidade de volume de meio. O título é expresso tipicamente em unidades de miligramas de polipéptido ou proteína por mililitro de meio.

Descrição Detalhada de Certas Formas de Realização Preferidas

A presente invenção proporciona sistemas melhorados para a produção de proteínas e/ou polipéptidos através de cultura de células. Em particular, a invenção proporciona sistemas que minimizam a produção de um ou mais produtos metabólicos prejudiciais para o crescimento celular, a viabilidade, e/ou produção ou qualidade da proteína. Numa forma de realização preferida da presente invenção, a cultura celular é uma cultura descontínua ou de alimentação contínua. Outras certas formas de realização preferidas da invenção são discutidas em detalhe abaixo. Os especialistas na técnica entenderão, todavia, que várias modificações a estas formas de realização preferidas estão dentro do âmbito das reivindicações anexas. São as reivindicações e seus equivalentes que definem o âmbito da presente invenção, que não está, e não deve estar, limitada a, ou por, esta descrição de certas formas de realização preferidas.

Polipéptidos

Qualquer polipéptido TNFR-Fc que se pode expressar numa célula hospedeira pode ser produzido de acordo com a presente invenção. O polipéptido pode ser expresso a partir de um gene que é endógeno para a célula hospedeira, ou a partir de um gene que é introduzido na célula hospedeira através de engenharia genética. O polipéptido pode ser um que ocorra na natureza, ou pode possuir alternativamente uma sequência que foi modificada ou seleccionada por mão humana. Um polipéptido modificado pode ser montado a partir de outros segmentos de polipéptido que ocorrem individualmente na natureza, ou pode incluir um ou mais segmentos que não ocorrem naturalmente.

Noutra forma de realização, o anticorpo é um de anticorpos anti-GDF-8 humanos denominado Myo29, Myo28, e Myo22, e os anticorpos e fragmentos de ligação ao antigénio deles derivados. Estes anticorpos são capazes de se ligarem a GDF-8 madura com elevada afinidade, inibir actividade de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* como demonstrado, por exemplo, por inibição de ligação a ActRIIB ensaios de gene repórter, e podem inibir a actividade de GDF-8 associada com a regulação negativa de massa de músculo esquelético e densidade óssea. Ver, e.g., Veldman, *et al*, Pedido de Patente U.S. Nº 20040142382.

Receptores

Outra classe de polipéptidos que demonstraram ser eficazes como agentes farmacêuticos e/ou comerciais inclui receptores. Os receptores são tipicamente glicoproteínas trans-membranares que funcionam para o reconhecimento de um ligando de sinalização extracelular. Os receptores possuem tipicamente um domínio de cinase de proteína adicionalmente ao domínio de reconhecimento do ligando, que inicia uma via de sinalização através de moléculas intracelulares de alvo de fosforilação após ligação ao ligando, conduzindo a alterações de desenvolvimento ou metabólicas na célula. Numa forma de realização, os receptores de interesse são modificados de modo a remover o(s) domínio(s) de transmembrana e/ou intracelular, no lugar dos quais pode ser ligado opcionalmente um domínio Ig.

Numa forma de realização particularmente preferida, os inibidores de factor de necrose tumoral, na forma de receptores de factor alfa e beta da necrose tumoral (TNFR-1; EP 417 563 publicado em 20 de Março de 1991; e TNFR-2, EP 417 014 publicado em 20 de Março de 1991) são expressos de acordo com a presente invenção (para revisão, ver Naismith e Sprang, *J Inflamm.* 47(1-2):1-7 (1995-96)). De acordo com uma forma de realização, o inibidor do factor de necrose tumoral compreende um receptor de TNF solúvel e, preferencialmente um TNFR-Ig. Numa forma de realização, os inibidores de TNF preferidos da presente invenção são formas solúveis de TNFRI e TNFRII, assim como proteínas de

ligação a TNF solúveis, noutra forma de realização, a fusão TNFR-Ig é um TNFR:Fc, um termo que, como aqui utilizado, refere-se a "*etanercept*", que é um dímero de duas moléculas da porção extracelular do receptor p75 TNF- α , consistindo cada molécula de uma porção Fc de 235 aminoácidos de IgG.sub.1. humana.

Em geral, os profissionais da presente invenção seleccionarão o seu polipéptido de interesse, e conhecerão a sua sequência de aminoácidos precisa. As técnicas da presente invenção foram aplicadas com sucesso à produção de diversos polipéptidos incluindo, por exemplo, um anticorpo monoclonal humano dirigido contra o factor 8 de crescimento e diferenciação (Exemplos 1, 3, 4, 7-14), anticorpo anti Lewis Y humanizado (Exemplos 5 e 6), anti-ABeta (Exemplo 15) e uma proteína de fusão com Fc dimérica do pré-receptor do factor da necrose tumoral (Exemplo 16), indicando que a presente invenção será útil para a expressão de uma variedade de diferentes polipéptidos e proteínas. Qualquer dada proteína que se pretende expressar de acordo com a presente invenção possuirá as suas próprias características idiossincráticas e pode influenciar a densidade celular ou a viabilidade das células cultivadas, e pode ser expressa a níveis mais baixos do que outro polipéptido ou proteína cultivado em condições de cultura idênticas. Um especialista na técnica será capaz de modificar apropriadamente os passos e as composições da presente invenção de modo a optimizar o crescimento celular e/ou a produção de qualquer dado polipéptido ou proteína expressos.

Elementos de controlo genético

Como será claro para aqueles com competências normais na arte, os elementos de controlo genético podem ser empregues para regular a expressão genética do polipéptido ou proteína. Esses elementos de controlo genético devem ser seleccionados para serem activos na célula hospedeira relevante. Os elementos de controlo podem ser constitutivamente activos ou podem ser indutíveis em circunstâncias definidas. Os elementos de controlo indutíveis são particularmente úteis quando a proteína expressa é tóxica ou possui efeitos de outra forma prejudiciais sobre o crescimento e/ou a viabilidade celular. Nesses casos, a expressão de regulação do polipéptido ou proteína através de elementos de controlo indutíveis pode melhorar a viabilidade celular, a densidade celular, e /ou o rendimento total do polipéptido ou proteína expressos. São conhecidos e estão disponíveis na técnica um grande número de elementos de controlo úteis na prática da presente invenção.

Promotores de mamífero constitutivos representativos que podem ser utilizados de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, o promotor da transferase da fosforribosil de hipoxantina (HPTR), o promotor da desaminase de adenosina, o promotor da cinase de piruvato, o promotor da beta-actina, assim como outros promotores constitutivos conhecidos daqueles com

competências normais na técnica. Adicionalmente, os promotores virais que demonstraram dirigir a expressão constitutiva das sequências codificantes em células eucarióticas incluem, por exemplo, promotores do vírus de símios, promotores do vírus herpes simplex, promotores do vírus papilloma, promotores de adenovírus, promotores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), promotores do vírus do sarcoma de Rous, promotores do citomegalovírus (CMV), as repetições terminais longas (LTRs) do vírus da leucemia de murino de Moloney e outros retrovírus, o promotor da cinase de timidina do vírus herpes simplex, assim como outros promotores virais conhecidos daqueles com competências normais na técnica.

Os promotores indutíveis conduzem a expressão de sequências codificantes ligadas operacionalmente na presença de um agente de indução também podem ser utilizados de acordo com a presente invenção. Por exemplo, em células de mamíferos, o promotor da metalotioneína induz a transcrição de sequências codificantes a jusante na presença de certos íons metálicos. Outros promotores indutíveis serão reconhecidos por e/ou conhecidos daqueles com competências normais na técnica.

Em geral, uma sequência de expressão genética também incluirá sequências de não transcrição 5' e não tradução 5' envolvidas com a iniciação da transcrição e tradução, respectivamente, tal como uma caixa TATA, sequência de protecção, sequência CAAT, e semelhantes. Os

elementos intensificadores podem ser utilizados opcionalmente para aumentar os níveis de expressão dos polipéptidos ou proteínas a serem expressos. Exemplos de elementos intensificadores que demonstraram funcionar em células de mamíferos incluem o intensificador do gene precoce de SV40, como descrito em Dijkema *et al.*, *EMBO J.* (1985) 4: 761 e o intensificador/promotor derivado da repetição do terminal longo (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous (RSV), como descrito em Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982b) 79:6777 e citomegalovírus humano, como descrito em Boshart *et al.*, *Cell* (1985) 41:521.

Os sistemas para ligar os elementos de controlo às sequências codificantes são bem conhecidos na técnica (técnicas gerais de biologia molecular e DNA recombinante são descritas em Sambrook, Fritsch, e Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Vectores comerciais adequados para inserir a sequência codificante preferida para expressão em várias células de mamíferos numa variedade de condições de crescimento e indução são também bem conhecidas na técnica.

Introdução de sequências codificantes e elementos de controlo relacionados em células hospedeiras

Métodos adequados para introduzir em células hospedeiras de mamíferos ácidos nucleicos suficientes para alcançar a expressão dos polipéptidos ou proteínas de

interesse são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Gething et al., *Nature*, 293:620-625(1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117 060; e EP 117 058, todos aqui incorporados por referência.

Para células de mamíferos, os métodos de transformação preferidos incluem o método de precipitação com fosfato de cálcio, e van der Erb, *Virology*, 52:456-457 (1978) ou a lipofectamina™. (Gibco BRL) Método de Hawley-Nelson, *Focus* 15:73 (1993). Os aspectos gerais de transformações do sistema de hospedeiro de células de mamíferos foram descritos por Axel na Pat. U.S. N°. 4 399 216 emitido em 16 de Agosto de 1983. Para várias técnicas para transformar células de mamíferos, ver Keown et al., *Methods in Enzymology* (1989), Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), e Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988). Exemplos representativos não limitantes de vectores adequados para a expressão de polipéptidos ou proteínas em células de mamíferos incluem pCDNA1; pCD, ver Okayama, et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMCIneoPoly-A, ver Thomas, et al. (1987) *Cell* 51:503-512; e um vector de baculovírus, tal como pAC 373 ou pAC 610.

Em formas de realização preferidas, o polipéptido ou proteína é estavelmente transfectado na célula hospedeira. Todavia, uma das competências normais na técnica irá reconhecer que a presente invenção pode ser utilizada com células de mamíferos transfectadas quer transientemente ou estavelmente.

Células

Qualquer célula ou tipo de célula de mamífero susceptível à cultura celular, e à expressão de polipéptidos, pode ser utilizada de acordo com a presente invenção. Exemplos não limitantes de células de mamíferos que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção incluem a linha de mieloma de murganho BALB/c (NSO/1, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Holanda)); linha celular CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha celular de rim embrionário (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês +/-DHFR (CHO, Urlauband Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de murganho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251(1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células do carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de murganho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2). Numa forma de realização particularmente

preferida, a presente invenção é utilizada na cultura de, e na expressão de, polipéptidos e proteínas das linhas celulares CHO.

Adicionalmente, qualquer número de linhas celulares de hibridoma comercialmente e não comercialmente disponíveis que expressam polipéptidos ou proteínas pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Um especialista na técnica entenderá que as linhas celulares de hibridoma podem possuir diferentes necessidades nutricionais e/ou podem necessitar de diferentes condições de cultura para crescimento óptimo e expressão de polipéptido ou proteína, e será capaz de modificar as condições conforme a necessidade.

Conforme mencionado acima, em muitos casos as células serão seleccionadas ou modificadas para produzir níveis elevados de proteína ou polipéptido. Frequentemente, as células são geneticamente modificadas para produzir níveis elevados de proteína, por exemplo através da introdução de um gene codificando a proteína ou polipéptido de interesse e/ou através da introdução de elementos de controlo que regulam a expressão do gene (quer seja endógeno ou introduzido) codificando o polipéptido de interesse.

Certos polipéptidos podem possuir efeitos prejudiciais no crescimento celular, viabilidade celular ou algumas outras características das células que em último

caso limitam a produção do polipéptido ou proteína de interesse, de algum modo. Mesmo entre uma população de células de um tipo particular modificadas para expressar um polipéptido específico, a variabilidade numa população celular existe de modo a que certas células individuais irão crescer melhor e/ou produzir mais polipéptido de interesse. Em certas formas de realização preferidas da presente invenção, a linha celular é empiricamente seleccionada pelo profissional para um crescimento robusto nas condições particulares escolhidas para a cultura das células. Em formas de realização particularmente preferidas, são seleccionadas células individuais modificadas para expressar um polipéptido particular para produção em grande escala com base no crescimento celular, densidade celular final, percentagem de viabilidade celular, título do polipéptido expresso ou qualquer combinação destas ou de quaisquer outras condições consideradas importantes pelo profissional.

Fase da Cultura Celular

Processos típicos para produzir um polipéptido de interesse incluem culturas descontínuas e culturas semi-contínuas. Os processos de cultura descontínua compreendem tradicionalmente a inoculação de uma cultura de produção em grande escala com uma cultura de sementeira de uma densidade celular particular, cultivando as células em condições que conduzem ao crescimento celular e viabilidade, recolhendo a cultura quando as células alcançam uma

densidade celular especificada, e purificando o polipéptido expresso. Processos de cultura semi-contínua incluem um passo ou passos adicionais de suplementar a cultura descontínua com nutrientes e outros componentes que são consumidos durante o crescimento das células. Um problema persistente e não resolvido com as culturas descontínuas e semi-contínuas tradicionais é a produção de produtos de resíduos metabólicos, que possuem efeitos prejudiciais no crescimento celular, viabilidade, e produção de polipéptidos expressos. Dois produtos de resíduos metabólicos que possuem efeitos particularmente prejudiciais são lactato e amónio, que são produzidos como um resultado do metabolismo da glucose e da glutamina, respectivamente. Adicionalmente à produção enzimática de amónio como um resultado do metabolismo da glutamina, o amónio também se acumula em culturas celulares como um resultado da degradação não metabólica ao longo do tempo. A presente invenção proporciona um método melhorado de produção em grande escala de polipéptidos que minimiza os efeitos prejudiciais do amónio e lactato retardando e mesmo revertendo a acumulação destes produtos de resíduo em culturas celulares. Um especialista na técnica reconhecerá que a presente invenção pode ser empregue em qualquer sistema no qual as células sejam cultivadas incluindo, mas não limitadas a, sistemas descontínuos, semi-contínuos e de perfusão. Em certas formas de realização preferidas da presente invenção, as células são cultivadas em sistemas descontínuos ou semi-contínuos.

Meios

As formulações dos meios tradicionais, incluindo meios disponíveis comercialmente, tais como Ham's F10 (Sigma), Meio Mínimo Essencial ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma), continham níveis relativamente elevados de glucose e glutamina em comparação com outros aminoácidos. Estes componentes foram pensados para serem requeridos em abundância uma vez que eles são as principais fontes de energia metabólica para as células. Todavia, o consumo rápido destes nutrientes conduz à acumulação de lactato e amónio, como descrito acima. Adicionalmente, os níveis iniciais elevados de glucose e glutamina e a subsequente acumulação de lactato e amónio resultam em osmolaridade elevada, uma condição que é ela própria frequentemente prejudicial para o crescimento celular, a viabilidade celular e a produção de polipéptidos.

A presente invenção proporciona uma variedade de formulações dos meios que, quando utilizados de acordo com outros passos de cultura aqui descritos, minimiza e até reverte a acumulação de lactato e amónio. As formulações dos meios da presente invenção que demonstraram possuir efeitos benéficos no crescimento celular e/ou viabilidade ou na expressão do polipéptido ou proteína incluem um ou mais de: i) uma quantidade cumulativa de aminoácidos por unidade de volume superior a cerca de 70 mM, ii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para asparagina

cumulativa inferior a cerca de 2, iii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para aminoácidos cumulativos totais inferior a cerca de 0,2, iv) uma proporção molar de ião inorgânico cumulativo para aminoácidos totais cumulativos entre cerca de 0,4 para 1, e v) uma quantidade cumulativa combinada de glutamina e asparagina por unidade de volume superior a cerca de 16 mM. Um especialista na técnica entenderá que "cumulativo", como utilizado acima, refere-se à quantidade total de um componente particular ou componentes adicionados ao longo da cultura celular, incluindo componentes adicionados no início da cultura e componentes adicionados subsequentemente. Um especialista na técnica entenderá que as formulações dos meios da presente invenção englobam ambos os meios definidos e não definidos.

As formulações tradicionais dos meios começam com um nível relativamente baixo de aminoácidos totais em comparação com as formulações de meios da presente invenção. Por exemplo, o meio de cultura celular tradicional conhecido como DME-F12 (uma mistura de 50:50 de meios de Eagle Modificado por Dulbecco e meio F12 de Ham) possui um teor de aminoácidos totais de 7,29 mM, e o meio de cultura celular tradicional conhecido como RPMI-1640 possui um conteúdo de aminoácidos totais de 6,44 mM (Ver e.g., H.J.Morton, *In Vitro*, 6:89-108 (1970), R.G. Ham, *Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA)*, 53:288-293 (1965), G.E. Moore et al., *J. Am. Medical Assn.*, 199:519-24 (1967)). Em certas formas de realização da presente invenção, a concentração de aminoácidos nos meios de cultura é preferencialmente superior a

cerca de 70 mM. Ainda mais preferencialmente, as formulações dos meios da presente invenção contêm concentrações de aminoácidos superiores a cerca de 70 mM nos meios de partida. Foi demonstrado que quando as concentrações de aminoácidos dos meios de partida estão neste intervalo, a densidade celular e o título são aumentados ao longo do período de crescimento da cultura (ver Exemplo 13).

Adicionalmente, em certas formas de realização da presente invenção, a proporção molar da glutamina para asparagina nos meios de cultura é reduzida em comparação com outros meios disponíveis e não disponíveis comercialmente. Preferencialmente, a proporção molar de glutamina para asparagina nos meios de cultura é inferior a cerca de dois.

Adicionalmente, em certas formas de realização da presente invenção, a proporção molar da glutamina para os aminoácidos totais nos meios de cultura é reduzida em comparação com outros meios disponíveis e não disponíveis comercialmente. Preferencialmente, a proporção molar da glutamina para os aminoácidos totais nos meios de cultura inferior a cerca de 0,2.

Um resultado interessante e inesperado do abaixamento da proporção molar de glutamina para asparagina ou na concentração total de aminoácidos nos meios de partida de acordo com a presente invenção foi que adicionalmente a uma diminuição observada na acumulação de amónio, foi também observada uma diminuição na acumulação

de lactato. Em certas formas de realização, os níveis de amónio e lactato acumulados não são apenas inferiores aos das culturas de controlo, mas de facto, na realidade diminuem após uma acumulação inicial (por exemplo, ver Exemplos 3 e 7).

Boraston (Patente US Número 5 871 999) revelou um meio de cultura no qual a proporção molar de iões inorgânicos totais para aminoácidos totais está entre 1 e 10. Boraston demonstrou que fornecendo um meio de cultura no qual a proporção molar de iões inorgânicos totais para aminoácidos totais está no intervalo, a agregação de células CHO cultivadas no meio é diminuída. Noutra forma de realização preferida da presente invenção, a proporção molar de iões inorgânicos totais para aminoácidos totais no meio de cultura é ainda mais reduzida, para entre cerca de 0,4 até 1. Como apresentado no Exemplo 13, a redução desta proporção desde 1,75 até aproximadamente 0,7 resulta num aumento marcado na densidade celular e produção de polipéptido ou proteína expressa ao longo do período de crescimento da cultura.

Noutra forma de realização preferida da presente invenção, o meio de cultura contém uma concentração de glutamina e asparagina combinada entre cerca de 16 e 36 mM. Como apresentado no Exemplo 14, Tabela 22, os meios que contêm uma concentração total combinada de glutamina e asparagina neste intervalo apresentam títulos mais elevados de polipéptido expresso do que os meios que contêm um total

combinado de glutamina e asparagina fora deste intervalo. Um especialista na técnica será capaz de escolher a concentração exacta combinada de glutamina e asparagina neste intervalo, de modo a otimizar o crescimento celular e/ou viabilidade e para maximizar a produção do polipéptido expresso.

Para além disso, um especialista na técnica reconhecerá que qualquer uma das condições listadas acima podem ser utilizadas quer isoladamente ou em várias combinações umas com as outras. Utilizando a formulação dos meios que apresentam uma, algumas ou todas as características acima, um especialista na técnica será capaz de otimizar o crescimento celular e/ou a viabilidade e para maximizar a produção do polipéptido expresso.

Qualquer uma destas formulações dos meios revelados na presente invenção pode opcionalmente ser suplementada conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento, em particular iões (tais como sódio, cloro, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões, vitaminas, nucleósidos ou nucleótidos, oligoelementos (compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais muito baixas), aminoácidos, lípidos, hidrolisados de proteína, ou glucose ou outra fonte de energia. Em certas formas de realização da presente invenção, pode ser benéfico suplementar os meios com indutores químicos, tais como hexametileno-bis(acetamida) ("HMBA") e butirato de sódio ("NaB"). Estes suplementos opcionais podem ser

adicionados no início da cultura ou podem ser adicionados num ponto mais adiante de modo a reabastecer os nutrientes empobrecidos ou por outra razão. Um especialista na técnica estará ciente de quaisquer suplementos desejáveis ou necessários que podem estar incluídos nas formulações reveladas dos meios.

Proporcionar uma cultura celular de mamíferos

São conhecidos na técnica vários métodos de preparação de células de mamíferos para a produção de proteínas ou polipéptidos através de cultura descontínua ou semi-contínua. Como descrito acima, um ácido nucleico suficiente para alcançar a expressão (tipicamente um vector contendo o gene codificando o polipéptido ou proteína de interesse e quaisquer elementos de controlo genético ligados operacionalmente) pode ser introduzido na linha de células hospedeiras por qualquer número de técnicas bem conhecidas. Tipicamente, as células são rastreadas para determinar quais das células incorporaram na realidade o vector e expressam o polipéptido ou proteína de interesse. Métodos tradicionais de detectar um polipéptido ou proteína particular de interesse expressa por células de mamíferos incluem, mas não estão limitadas a imuno-histoquímica, imunoprecipitação, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, SDS-PAGE, transferências de Western, ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA), técnicas de cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC), ensaios de actividade biológica e cromatografia de

afinidade. Um especialista na técnica estará ciente de outras técnicas apropriadas para detectar polipéptidos ou proteínas expressas. Se as células hospedeiras múltiplas expressam o polipéptido ou proteína de interesse, algumas ou a totalidade das técnicas listadas podem ser utilizadas para determinar quais das células expressam esse polipéptido ou proteína aos níveis mais elevados.

Assim que uma célula que expressa o polipéptido ou proteína de interesse foi identificada, a célula é propagada em cultura através de qualquer um de uma variedade de métodos bem conhecidos de um especialista na técnica. A célula que expressa o polipéptido ou proteína de interesse é tipicamente propagada crescendo-a a uma temperatura e num meio que conduz à sobrevivência, crescimento e viabilidade da célula. O volume inicial da cultura pode ser de qualquer tamanho, mas é frequentemente mais pequeno do que o volume da cultura do biorreactor de produção utilizado na produção final do polipéptido ou proteína de interesse, e frequentemente as células são passadas várias vezes em biorreactores de volume crescente antes de semear o biorreactor de produção. A cultura celular pode ser agitada ou misturada para aumentar a oxigenação do meio e a dispersão de nutrientes às células. Alternativamente ou adicionalmente, dispositivos de disseminação especiais que são bem conhecidos na técnica podem ser utilizados para aumentar e controlar a oxigenação da cultura. De acordo com a presente invenção, um especialista na técnica entenderá que pode ser benéfico para controlar ou regular certas condições internas do

biorreactor, incluindo, mas não limitadas a pH, temperatura, oxigenação, etc.

A densidade celular de partida no biorreactor de produção pode ser seleccionada por um especialista na técnica. De acordo com a presente invenção, a densidade celular inicial no biorreactor de produção pode ser tão baixo como uma célula única por volume de cultura. Em formas de realização preferidas da presente invenção, as densidades celulares iniciais no biorreactor de produção pode variar desde cerca de 2×10^2 células viáveis por mL até cerca de 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 ou 10×10^6 células viáveis por mL e superior.

As culturas celulares iniciais e intermédias podem ser cultivadas até qualquer densidade desejada antes de semear o próximo biorreactor de produção intermediário ou final. É preferido que a maioria das células permaneça viva antes de semear, embora a viabilidade total ou próxima do total não seja necessária. Numa forma de realização da presente invenção, as células podem ser removidas a partir do sobrenadante, por exemplo, através de centrifugação de baixa velocidade. Pode ser também desejável lavar as células removidas com um meio antes de semear o biorreactor seguinte para remover quaisquer produtos de resíduos metabólicos ou componentes do meio indesejados. O meio pode ser o meio no qual as células foram previamente crescidas ou pode ser um meio diferente ou uma solução de lavagem seleccionada pelo profissional da presente invenção.

As células podem ser então diluídas até uma densidade apropriada para semear o biorreactor de produção. Numa forma de realização preferida da presente invenção, as células são diluídas no mesmo meio que será utilizado no biorreactor de produção. Alternativamente, as células podem ser diluídas noutro meio ou solução, dependendo das necessidades e desejos do profissional da presente invenção ou para acomodar requisitos particulares das próprias células, por exemplo, se elas se destinam a ser armazenadas durante um período de tempo curto antes de semear o biorreactor de produção.

Fase de Crescimento Inicial

Assim que o biorreactor de produção tenha sido semeado como descrito acima, a cultura celular é mantida na fase de crescimento inicial em condições que conduzem à sobrevivência, crescimento e viabilidade da cultura celular. As condições precisas variarão dependendo do tipo celular, do organismo a partir do qual a célula derivou, e da natureza e carácter do polipéptido ou proteína expressos.

De acordo com a presente invenção, o biorreactor de produção pode ser de qualquer volume que seja apropriado para a produção de polipéptidos ou proteínas em larga escala. Numa forma de realização preferida, o volume do biorreactor de produção tem pelo menos 500 litros. Noutras formas de realização preferidas, o volume do biorreactor de

produção tem 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 litros ou mais, ou qualquer volume entre estes. Um especialista na técnica estará ciente de, e será capaz de, seleccionar um biorreactor adequado para utilização na prática da presente invenção. O biorreactor de produção pode ser construído a partir de qualquer material que conduz ao crescimento celular e viabilidade que não interfere com a expressão ou estabilidade do polipéptido ou proteína produzidos.

A temperatura da cultura celular na fase de crescimento inicial será seleccionada com base, principalmente no intervalo de temperaturas nas quais a cultura celular permanece viável. Por exemplo, durante a fase inicial do crescimento, as células CHO crescem bem a 37°C. Em geral, a maioria das células de mamíferos crescem bem num intervalo de cerca de 25°C até 42°C. Preferencialmente, as células de mamíferos crescem bem no intervalo desde cerca de 35°C até 40°C. As pessoas com competências normais na técnica serão capazes de seleccionar a temperatura ou temperaturas apropriadas par ao crescimento das células, dependendo das necessidade das células e das necessidade de produção do profissional.

Numa forma de realização da presente invenção, a temperatura da fase inicial do crescimento é mantida como uma temperatura única, constante. Noutra forma de realização, a temperatura da fase inicial do crescimento é mantida num intervalo de temperaturas. Por exemplo, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída de forma

estável durante a fase inicial do crescimento. Alternativamente, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída por quantidades discretas em várias vezes durante a fase inicial do crescimento. Um especialista na técnica será capaz de determinar se deve ser utilizada uma temperatura única ou múltipla, e se a temperatura deve ser ajustada de forma estável ou por quantidades discretas.

As células podem ser cultivadas durante a fase inicial do crescimento durante uma quantidade de tempo maior ou mais pequena, dependendo das necessidades do profissional e da necessidade das próprias células. Numa forma de realização, as células são cultivadas durante um período de tempo suficiente para alcançar uma densidade de células viáveis que é uma dada percentagem da densidade celular máxima viável que as células iriam eventualmente alcançar se deixadas crescer sem perturbação. Por exemplo, as células podem ser crescidas 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 da densidade de células viáveis máxima.

Noutra forma de realização, as células são deixadas crescer durante um período de tempo definido. Por exemplo, dependendo da concentração inicial da cultura celular, da temperatura à qual as células são cultivadas, e da taxa de crescimento intrínseca das células, as células podem ser crescidas 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 ser deixadas crescer durante um mês ou mais. As células seriam crescidas durante 0 dias no biorreactor de produção se o seu crescimento num biorreactor de sementeira, na temperatura da fase inicial do crescimento, fosse suficiente para que a densidade celular viável no biorreactor de produção no momento do inóculo estivesse já na percentagem desejada da densidade celular viável máxima. O profissional da presente invenção será capaz de seleccionar a duração da fase inicial de crescimento dependendo das necessidade de produção do polipéptido ou proteína e das necessidades das próprias células.

A cultura celular pode ser agitada ou abanada durante a fase inicial da cultura de modo a aumentar a oxigenação e dispersão de nutrientes às células. De acordo com a presente invenção, um especialista na técnica entenderá que pode ser benéfico controlar ou regular certas condições internas do biorreactor durante a fase inicial do crescimento, incluindo mas não limitado a pH, temperatura, 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 de disseminação que são bem conhecidos na técnica.

Desvio das Condições de Cultura

De acordo com os ensinamentos da presente

invenção, no final da fase inicial do crescimento, pelo menos uma das condições de cultura podem ser alterada de modo a que seja aplicado um segundo conjunto de condições de cultura e ocorra uma mudança metabólica na cultura. A acumulação de metabolitos inibidores, principalmente lactato e amónio, inibe o crescimento. Uma mudança metabólica, acompanhada por, e.g., uma alteração na temperatura, pH, osmolalidade ou nível de indução química da cultura celular, pode ser caracterizada por uma redução na proporção de uma taxa de produção de lactato específica para um taxa de consumo de glucose específica. Numa forma de realização não limitante, as condições de cultura são mudadas alterando a temperatura da cultura. Contudo, como é conhecido na técnica, a alteração da temperatura não é o único mecanismo através do qual pode ser alcançado um desvio metabólico apropriado. Por exemplo, também pode ser alcançada uma tal mudança metabólica alterando outras condições de cultura incluindo, mas não limitadas a, pH, osmolalidade, e níveis de butirato de sódio. Como discutido acima, o momento da mudança da cultura será determinado pelo profissional da presente invenção, com base nas necessidades da produção de polipéptido ou proteína ou das necessidades das próprias células.

Quando se altera a temperatura da cultura, a alteração da temperatura pode ser relativamente gradual. Por exemplo, pode demorar várias horas ou dias para completar a alteração da temperatura. Alternativamente, a alteração da temperatura pode ser relativamente abrupta.

Por exemplo, a alteração da temperatura pode estar completa em menos de várias horas. Dado o equipamento de produção e controlo apropriado, tal como é convencional na produção comercial em grande escala de polipéptidos ou proteínas, a alteração da temperatura pode ainda ficar completa em menos de uma hora.

A temperatura da cultura celular na fase de crescimento subsequente será seleccionada com base principalmente no intervalo de temperaturas nas quais a cultura celular permanece viável e expressa polipéptidos ou proteínas recombinantes em níveis comercialmente adequados. Em geral, a maioria das células de mamíferos permanece viável e expressa polipéptidos ou proteínas recombinantes em níveis comercialmente adequados num intervalo de cerca de 25°C até 42°C. Preferencialmente, as células de mamíferos permanecem viáveis e expressam polipéptidos ou proteínas recombinantes a níveis comercialmente adequados no intervalo desde cerca de 25°C até 35°C. As pessoas com competências normais na técnica serão capazes de seleccionar a temperatura ou temperaturas apropriadas para o crescimento de células, dependendo das necessidades das células e das necessidades de produção do profissional.

Numa forma de realização da presente invenção, a temperatura da fase de crescimento subsequente é mantida a uma temperatura simples, constante. Noutra forma de realização, a temperatura da fase de crescimento subsequente é mantida dentro de um intervalo de temperaturas. Por

exemplo, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída de forma estável durante a fase de crescimento subsequente. Alternativamente, a temperatura pode ser aumentada ou diminuída por quantidades discretas a vários tempos durante a fase de crescimento subsequente. Um especialista na técnica entenderá que estão englobadas nesta forma de realização múltiplas alterações de temperatura discreta. Por exemplo, a temperatura pode ser alterada uma vez, as células mantidas a esta temperatura ou intervalo de temperatura durante um certo período de tempo, após o qual a temperatura pode ser alterada novamente - quer para uma temperatura mais elevada ou mais baixa. A temperatura da cultura após cada alteração discreta pode ser constante ou pode ser mantida dentro de um certo intervalo de temperaturas.

No Exemplo 16, são mostrados resultados que demonstram a eficácia de empregar duas alterações de temperatura sucessivas, embora seja entendido pelas pessoas com competências normais na técnica que, de acordo com a presente invenção, podem ser utilizadas três ou mais alterações de temperatura sucessivas para aumentar a viabilidade ou a densidade celular e/ou aumentar a expressão de polipéptidos ou proteínas recombinantes. A temperatura ou intervalos de temperatura da cultura celular após cada alteração de temperatura sucessiva pode ser superior ou inferior à(s) temperatura(s) ou intervalo(s) de temperatura(s) precedendo a alteração. Numa forma de realização preferida da presente invenção, cada temperatura

sucessiva ou intervalo de temperatura é mais baixa do que a temperatura ou intervalo de temperatura anterior.

Fase de Produção Subsequente

De acordo com a presente invenção, assim que as condições da cultura celular tenham sido alteradas como discutido acima, a cultura celular é mantida durante uma fase de produção subsequente num segundo conjunto de condições de cultura que conduzem à sobrevivência e viabilidade da cultura celular e é apropriada para a expressão do polipéptido ou proteína desejada a níveis comercialmente adequados.

Como discutido acima, a cultura pode ser alterada mudando uma ou mais de várias condições de cultura incluindo, mas não limitadas a, temperatura, pH, osmolalidade, e níveis de butirato de sódio. Numa forma de realização, a temperatura da cultura é alterada. De acordo com esta forma de realização, durante a fase subsequente de produção, a cultura é mantida a uma temperatura ou intervalo de temperatura que é inferior à temperatura ou intervalo de temperatura da fase de crescimento inicial. Por exemplo, durante a fase subsequente de produção, as células CHO expressam polipéptidos e proteínas recombinantes bem dentro de um intervalo de 25°C até 35°C. Como discutido acima, podem ser empregues alterações de temperatura discreta múltiplas para aumentar a densidade ou viabilidade celular ou para aumentar a expressão do polipéptido ou proteína recombinantes.

De acordo com a presente invenção, as células podem ser mantidas na fase subsequente de produção até que seja alcançada uma densidade celular ou título de produção desejado. Numa forma de realização, as células são mantidas na fase subsequente de produção até que o título para o polipéptido ou proteína recombinante alcance um máximo. Noutras formas de realização, a cultura pode ser recuperada antes deste ponto, dependendo da produção necessária do profissional ou da necessidade das próprias células. Por exemplo, as células podem ser mantidas durante um período de tempo suficiente para alcançar uma densidade celular viável de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 por cento da densidade celular viável máxima. Em alguns casos, pode ser desejável permitir que a densidade celular viável alcance um máximo, e depois deixar que a densidade celular viável decline até um dado nível antes de recolher a cultura. Num exemplo extremo, pode ser desejável permitir que a densidade de células viáveis se aproxime ou alcance o zero antes de recolher a cultura.

Noutra forma de realização da presente invenção, as células são deixadas crescer durante um período de tempo definido durante a fase subsequente de produção. Por exemplo, dependendo da concentração da cultura celular no início da fase de crescimento subsequente, a temperatura na qual as células são cultivadas, e a taxa de crescimento intrínseco das células, as células podem ser cultivadas

durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias. Em alguns casos, as células podem ser deixadas crescer durante um mês ou mais. O profissional da presente invenção será capaz de escolher a duração da fase de produção subsequente dependendo das necessidades da produção do polipéptido ou proteína e da necessidade das próprias células.

Em certos casos, pode ser benéfico ou necessário suplementar a cultura celular durante a fase de produção subsequente com nutrientes ou outros componentes do meio que tenham sido empobrecidos ou metabolizados pelas células. Por exemplo, pode ser vantajoso suplementar a cultura celular com nutrientes ou outros componentes de meio que se observou terem sido empobrecidos durante a monitorização da cultura celular (ver a secção de 'Monitorização das Condições de Cultura', abaixo). Alternativamente ou adicionalmente, pode ser benéfico ou necessário suplementar a cultura celular antes da fase de produção subsequente. Como exemplos não limitantes, pode ser benéfico ou necessário para suplementar a cultura celular com hormonas e/ou outros factores de crescimento, em particular iões (tais como sódio, cloro, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões, vitaminas, nucleósidos ou nucleótidos, oligoelementos (compostos inorgânicos normalmente presentes a concentrações finais muito baixas), aminoácidos, lípidos, ou glucose ou outra fonte de energia.

Estes componentes suplementares podem ser todos

adicionados à cultura celular ao mesmo tempo, ou podem ser proporcionados à cultura celular numa série de adições. Numa forma de realização da presente invenção, os componentes suplementares são proporcionados à cultura celular em múltiplas vezes em quantidades proporcionais. Noutra forma de realização, pode ser desejável proporcionar apenas certos componentes suplementares inicialmente, e proporcionar os restantes componentes num tempo posterior. Ainda noutra forma de realização da presente invenção, a cultura celular é alimentada continuamente com estes componentes suplementares.

De acordo com a presente invenção, o volume total adicionado à cultura celular deve ser optimamente mantido numa quantidade mínima. Por exemplo, o volume total do meio ou solução contendo os componentes suplementares adicionados à cultura celular pode ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50% do volume da cultura celular antes de proporcionar os componentes suplementares.

A cultura celular pode ser agitada ou abanada durante a fase de produção subsequente de modo a aumentar a oxigenação e dispersão de nutrientes às células. De acordo com a presente invenção, uma pessoa com competências normais na técnica entenderá que pode ser benéfico controlar ou regular certas condições internas do biorreactor durante a fase de crescimento subsequente, incluindo, mas não limitado a pH, temperatura, 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 de disseminação que são bem conhecidos na técnica.

Monitorização das Condições de Cultura

Em certas formas de realização da presente invenção, o profissional pode considerar ser benéfico ou necessário monitorizar periodicamente condições particulares da cultura celular crescente. A monitorização das condições da cultura celular permite que o profissional determine se a cultura celular está a produzir polipéptido ou proteína recombinante a níveis sub-óptimos ou se a cultura está prestes a entrar numa fase de produção sub-ótima. De modo a monitorizar certas condições de cultura celular, será necessário remover pequenas fracções de uma cultura para análise. Um especialista na técnica entenderá que essa remoção pode introduzir potencialmente contaminação na cultura celular, e terá um cuidado apropriado para minimizar o risco dessa contaminação.

Como exemplo não limitante, pode ser benéfico ou necessário monitorizar a temperatura, pH, densidade celular, viabilidade celular, densidade celular viável integrada, níveis de lactato, níveis de amónio, osmolaridade, ou título do polipéptido ou proteína expressos. São bem conhecidos na arte numerosas técnicas que irão permitir a um especialista na técnica medir estas condições. Por

exemplo, a densidade celular pode ser medida utilizando um hemacitômetro, um contador Coulter, ou exame da densidade celular (CEDEX). A densidade de células viáveis pode ser determinada corando uma amostra de cultura com azul de Tripiano. Uma vez que apenas as células mortas incorporam o azul de Tripiano, a densidade de células viáveis pode ser determinada através da contagem do número total de células, dividindo o número de células que incorpora o corante pelo número total de células, e tomando a recíproca. Pode ser utilizada HPLC para determinar os níveis de lactato, amônio ou o polipéptido ou proteína expressos. Alternativamente, o nível do polipéptido ou proteína expressos pode ser determinado através de técnicas de biologia molecular convencionais, tais como coloração de géis de SDS-PAGE com coomassie, transferência de Western, ensaios de Bradford, ensaios de Lowry, ensaios do Biureto, e absorvência de UV. Pode também ser benéfico ou necessário monitorizar as modificações de pós-tradução do polipéptido ou proteína expressos, incluindo fosforilação e glicosilação.

Isolamento do Polipéptido Expresso

Em geral, será tipicamente desejável isolar e/ou purificar proteínas ou polipéptidos expressos de acordo com a presente invenção. Numa forma de realização preferida, o polipéptido ou proteína expresso é secretada no meio e desse modo as células e outros sólidos podem ser removidos, como por centrifugação ou filtração por exemplo, como um primeiro passo no processo de purificação. Esta forma de

realização é particularmente útil quando utilizada de acordo com a presente invenção, uma vez que os métodos e composições aqui descritos resultam em viabilidade celular aumentada. Como um resultado, morrem menos células durante um processo de cultura, e são libertadas menos enzimas proteolíticas para o meio que pode diminuir potencialmente o rendimento do polipéptido ou proteína expressos.

Alternativamente, o polipéptido ou proteína expressos é ligado à superfície da célula hospedeira. Nesta forma de realização, o meio é removido e as células hospedeiras que expressam o polipéptido ou proteína são lisadas como um primeiro passo no processo de purificação. A lise das células hospedeiras de mamíferos pode ser alcançada através de qualquer um de vários meios conhecidos daqueles com competências normais na técnica, incluindo rompimento físico por esferas de vidro e exposição a condições de pH elevado.

O polipéptido ou proteína pode ser isolado e purificado através de métodos convencionais incluindo, mas não limitado a, cromatografia (e.g., permuta iónica, cromatografia de afinidade, exclusão por tamanho, e hidroxiapatite), filtração em gel, centrifugação, ou solubilidade diferencial, precipitação com etanol ou através de qualquer outra técnica disponível para a purificação de proteínas (Ver, e.g., Scopes, "Protein Purification Principles and Practice" 2ª Edição, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. e Hames, B.D. (eds.),

"Protein Expression: A Practical Approach", Oxford Univ Press, 1999; e Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), "Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology" (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997). Para a cromatografia de imunoafinidade em particular, a proteína pode ser isolada através de sua ligação a uma coluna de afinidade compreendendo anticorpos que são criados contra essa proteína e foram afixados a um suporte estacionário. Alternativamente, os marcadores de afinidade, tais como uma sequência de revestimento de influenza, poli-histidina, ou glutathione-S-transferase podem ser ligados à proteína através de técnicas recombinantes convencionais para permitir a fácil purificação por passagem pela coluna de afinidade apropriada. Podem ser adicionados inibidores de protease, tais como fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), leupeptina, pepstatina ou aprotinina em qualquer um ou todos os estádios de modo a reduzir ou eliminar a degradação do polipéptido ou proteína durante o processo de purificação. Os inibidores de protease são particularmente desejados quando as células têm que ser lisadas de modo a isolar e purificar o polipéptido ou proteína expressos. Um especialista na técnica entenderá que a técnica de purificação exacta irá variar dependendo do carácter do polipéptido ou proteína a ser purificado, o carácter das células a partir das quais o polipéptido ou proteína é expresso, e a composição do meio para o qual as células foram cultivadas.

Formulações Farmacêuticas

Em certas formas de realização preferidas da invenção, os polipéptidos ou proteínas produzidos possuirão actividade farmacológica e serão úteis na preparação de agentes farmacêuticos. As composições inventivas, como descrito acima, podem ser administradas a um indivíduo ou podem ser primeiro formuladas para distribuição através de qualquer via disponível incluindo, mas não limitada às vias parentérica (e.g., intravenosa), intradérmica, subcutânea, oral, nasal, brônquica, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal, e vaginal. Composições farmacêuticas inventivas incluem tipicamente um polipéptido ou proteína purificados expressos a partir de uma linha celular de mamíferos, um agente de distribuição (i.e., um polímero catiónico, transportador molecular de péptido, tensio-activo, etc., como descrito acima) em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável. Como aqui utilizada, a linguagem "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de retardamento de absorção, e semelhantes, compatíveis com a administração farmacêutica. Também podem ser incorporados nas composições compostos activos suplementares.

É formulada uma composição farmacêutica para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os

seguintes componentes: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixados, poli-etilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminatetracético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste de tonicidade, tais como sódio, cloro ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser fechada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de dose múltipla fabricados de vidro ou plástico.

Composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem tipicamente soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injectáveis ou dispersão estéreis. Para a administração intravenosa, os veículos adequados incluem solução fisiológica salina, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluido até ao ponto em que exista capacidade de aplicação em seringa. As formulações farmacêuticas preferidas são estáveis nas condições de fabrico e armazenamento e devem ser preservadas contra a acção de contaminação de microrganismos, tais como

bactérias e fungos. Em geral, o veículo relevante pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno-glicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário, no caso de dispersão e através da utilização de tensioactivos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser alcançada através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser provocada incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o polipéptido ou proteína purificados na quantidade necessária num solvente apropriado com um, ou uma combinação, dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o polipéptido ou proteína purificados expressos a partir de uma linha celular de mamíferos num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima.

No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injectáveis, os métodos de preparação preferidos são secagem sob vácuo e liofilização, que produz um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma sua solução previamente esterilizada por filtração.

As composições orais incluem geralmente um diluente inerte ou um veículo comestível. Para o objectivo de administração oral terapêutica, o polipéptido ou proteína purificados podem ser incorporadas com excipientes e utilizados na forma de comprimidos, pastilhas, ou cápsulas, e.g., cápsulas de gelatina. As composições orais podem também ser preparadas utilizando um veículo fluido para utilização como um colutório. Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e semelhantes podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes, ou compostos de uma natureza semelhante: um ligante, tal como celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente, tal como amido ou lactose, um agente de desintegração, tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante, tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizador, tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante, tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante, tal como hortelã-pimenta, salicilato de metilo, ou aroma de laranja. As formulações para distribuição oral podem incorporar

vantajosamente agentes para melhorar a estabilidade no tracto gastrointestinal e/ou para aumentar a absorção.

Para administração por inalação, as composições inventivas compreendem um polipéptido ou proteína purificados expressos a partir de uma linha celular de mamíferos e um agente de distribuição são preferencialmente distribuídos na forma de um spray de aerossol de uma lata ou dispensador pressurizado que contém um propulsor adequado, e.g., um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador. A presente invenção contempla particularmente a distribuição das composições que utilizam um spray, inalador, ou outra distribuição directa para as vias respiratórias superiores e/ou inferiores. A administração intranasal de vacinas de DNA dirigidas contra o vírus influenza demonstrou induzir as respostas a células CD8 T, indicando que pelo menos algumas células no tracto respiratório podem incorporar DNA quando distribuído por esta via, e os agentes de distribuição da invenção irão aumentar a incorporação celular. De acordo com certas formas de realização da invenção as composições compreendendo um polipéptido purificado expresso a partir de uma linha celular de mamíferos e um agente de distribuição são formulados como partículas porosas grandes para administração por aerossóis.

A administração sistémica pode também ser por meios transmucosais ou transdérmicos. Para administração transmucosal ou transdérmica, são utilizados na formulação

penetrantes apropriados para que a barreira seja permeada. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, detergentes, sais de biliar, e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosal pode ser realizada através da utilização de sprays nasais ou supositórios. Para a administração transdérmica, o polipéptido ou proteína purificados e os agentes de distribuição são formulados em pomadas, salvos, géis, ou cremes como geralmente é conhecido na técnica.

As composições também podem ser preparadas na forma de supositórios (e.g., com bases de supositórios convencionais tais como manteiga de cacau e outros glicéridos) ou enemas de retenção para distribuição rectal.

Numa forma de realização, as composições são preparadas com veículos que irão proteger o polipéptido ou proteína contra a eliminação rápida do corpo, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo sistemas de distribuição por implantes e microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Métodos para a preparação dessas formulações serão óbvios para os especialistas na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Também podem ser utilizadas suspensões de lipossomas (incluindo lipossomas dirigidos

contra células infectadas com anticorpos monoclonais contra os antígenos virais) como veículos farmacologicamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, como descrito na Patente U.S. N°. 4 522 811.

É vantajoso formular composições orais ou parentéricas na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária como aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo a ser tratado; contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de polipéptido ou proteína activos calculados para produzirem o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário.

O polipéptido ou proteína expressos de acordo com a presente invenção podem ser administrados a vários intervalos e durante diferentes períodos de tempo conforme a necessidade, e.g., uma vez por semana durante entre cerca de 1 até 10 semanas, entre 2 a 8 semanas, entre cerca de 3 até 7 semanas, cerca de 4, 5, ou 6 semanas, etc. O profissional experimentado apreciará que certos factores podem influenciar a dosagem e o momento necessário para tratar eficazmente um indivíduo, incluindo, mas não limitado à gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, o estado de saúde geral e/ou a idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Geralmente, o

tratamento de um indivíduo com um polipéptido ou proteína como aqui descrito pode incluir um único tratamento ou, em muito casos, pode incluir uma série de tratamentos. É, para além disso, entendido que doses apropriadas pode depender da potência do polipéptido ou proteína e pode ser opcionalmente preparado à medida do recipiente particular, por exemplo, através da administração de doses crescentes até ser alcançada uma resposta pré-seleccionada desejada. É entendido que o nível de dose específica para qualquer indivíduo animal particular pode depender de uma variedade de factores incluindo a actividade do polipéptido ou proteína específicos empregues, a idade, peso corporal, estado geral de saúde, género, e dieta do indivíduo, o tempo de administração, a via de administração, a taxa de excreção, qualquer combinação de fármaco, e o grau de expressão ou actividade a ser modulada.

A presente invenção inclui a utilização de composições inventivas para o tratamento de animais não humanos. Consequentemente, as doses e métodos de administração podem ser seleccionados de acordo com princípios conhecidos da farmacologia e medicina veterinárias. Podem ser encontradas guias, por exemplo, em Adams, R. (ed.), "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", 8ª edição, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

As composições farmacêuticas inventivas podem ser incluídas num recipiente, embalagem, ou dispensador juntamente com as instruções para administração.

A descrição anterior deve ser entendida como sendo apenas representativa e não pretende ser limitante. Os métodos e materiais alternativos para implementar a invenção e também aplicações adicionais serão óbvios para um especialista na técnica, e pretendem estar incluídos nas reivindicações anexas.

Exemplos

Exemplo 1: Meio 1 incrementado para o processo semi-contínuo anti-GDF-8

Os processos semi-contínuos tradicionais para cultivar linhas celulares possuem várias desvantagens incluindo o tempo e os esforços necessários para administrar os processos de alimentação e a necessidade de equipamento especial em biorreactores de grande escala. O objectivo foi desenvolver um meio de sistema descontínuo para a produção de proteínas de interesse em biorreactores de grande escala que necessitam de sistemas de alimentação mínimos.

Materiais e Métodos

ESTIRPES E MEIOS: Foram modificadas células de Ovário de Hamster Chinês ("CHO") para expressar um anticorpo monoclonal contra o crescimento e diferenciação do factor 8 ("células anti-GDF-8") (ver Veldman *et al.*,

"Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor", US20040142382 A1). As células anti-GDF-8 foram utilizadas para testar um novo meio descontínuo. Os Meios 1 e Meio 2 foram comparados quanto às suas capacidades para suportar elevada densidade celular e viabilidade. As composições destes meios, assim como o Meio 3 são listadas na Tabela 1. Os meios foram realizados adicionando todos os componentes salvos para $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O meio é então ajustado para pH 7,25, a osmolaridade é registada e são então adicionados $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

CONDIÇÕES DE CULTURA:

Para as experiências em frasco, as células anti-GDF-8 foram cultivadas em frascos de agitação e passados três vezes. Para as experiências do biorreactor, as células anti-GDF-8 foram cultivadas em meios durante 12 dias, suplementados diariamente quer com 2% em volume de meio de alimentação Meio 4 a 20X (Tabela 3) ou 3% em volume de Meio 4 a 16X (Tabela 4) após o dia 5. Durante os primeiros 4 dias, as células foram cultivados a 37°C. No dia 5, as células foram mudadas para 31°C.

ANÁLISE DA AMOSTRA: Foram retiradas amostras diárias das culturas e foram analisadas para aminoácidos, vitaminas, ferro, fosfato, glucose e os níveis de glutamina.

Tabela 1. Composições do Meio 1, Meio 2 e Meio 3.

	Meio 1		Meio 2		Meio 3	
Aminoácidos	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanina	96,03	1,08	17,80	0,20	24,87	0,28
arginina	1186,99	6,82	347,97	2,00	423,43	2,43
asparagina•H ₂ O	713,59	4,76	75,00	0,50	173,90	1,16
ácido aspártico	318,53	2,39	28,20	0,20	62,72	0,40
cisteína•HCl•H ₂ O	70,01	0,40	70,19	0,40	70,01	0,40
cistina•2HCl	297,09	0,95	62,25	0,20	62,09	0,20
ácido glutâmico	158,59	1,08	29,40	0,20	41,08	0,28
glutamina	1892,40	12,96	1163,95	7,97	1162,40	7,96
glicina	95,88	1,28	30,00	0,40	35,92	0,48
histidina•HCl•H ₂ O	369,10	1,76	46,00	0,22	75,27	0,36
isoleucina,	623,63	4,76	104,99	0,80	151,90	1,16
leucina	852,31	6,51	104,99	0,80	172,89	1,32
lisina•HCl	945,96	5,20	145,99	0,80	218,38	1,20
metionina	291,82	1,96	29,80	0,20	53,55	0,36
fenilalanina	428,62	2,60	65,99	0,40	98,81	0,60
prolina	372,25	3,24	68,99	0,80	98,40	0,84
serina	904,71	8,62	126,00	1,20	273,07	2,60
treonina	513,39	4,31	94,99	0,80	132,81	1,12
triptofano	159,32	0,78	16,00	0,08	28,99	0,14
tirosina•2Na•2H ₂ O	560,81	2,15	103,79	0,40	145,10	0,56
valina	505,36	4,32	93,99	0,80	131,17	1,12
Vitaminas	mg/L	PM	mg/L	PM	mg/L	PM
biotina	2,00	8,21	0,20	0,82	0,38	1,49
pantotenato de cálcio	22,02	46,27	2,24	4,71	4,03	8,47
cloreto de colina	87,67	630,74	8,98	84,60	16,11	115,92
ácido fólico	25,95	58,84	2,85	6,01	4,76	10,80
inositol	123,39	685,47	12,60	69,99	22,84	125,79
nicotinamida	19,60	160,70	2,02	18,56	3,61	29,62
piridoxal•HCl	1,99	9,83	2,00	9,85	1,99	9,83

(continuação)

	Meio 1		Meio 2		Meio 3	
piridoxina•HCl	18,06	87,67	0,03	0,15	1,67	8,10
riboflavina	2,20	5,85	0,22	0,59	0,40	1,06
tiamina•HCl	21,51	63,84	2,17	6,44	3,92	11,64
vitamina B12	6,93	5,12	0,78	0,68	1,34	0,99
Sais Inorgânicos	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
CaCl ₂	115,78	1,04	116,09	1,05	116,78	1,04
KCl	310,94	4,17	311,77	4,18	310,94	4,17
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50	70,99	0,50	70,81	0,50
NaCl	1104,98	18,92	5539,00	94,85	3704,96	63,44
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	638,33	4,81	62,49	0,45	114,33	0,83
MgSO ₄	48,70	0,41	48,83	0,41	48,70	0,41
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,03	95,00			8,60	95,00
MgCl ₂	28,53	0,30	28,61	0,30	28,53	0,30
NaHCO ₂	2000,00	23,81	2440,00	29,04	2440,00	29,04
Oligoelementos	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
Selenito de Sódio	28,00	161,94	5,00	28,92	7,00	40,49
Fe (NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49,86	123,42	50,00	123,75	49,86	123,42
CuSO ₄	2,69	16,80	0,80	5,00	0,97	6,06
CuSO ₄ •5H ₂ O	11,24	45,00			7,49	30,00
FeSO ₄ •7H ₂ O	2503,85	9006,64	839,96	3021,45	1542,85	5649,81
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2734,77	9528,82	429,96	1498,12	1383,80	4821,59
MnSO ₄ •H ₂ O	0,26	1,51			0,17	1,01
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	210,00	739,27			140,00	492,84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,86	1,50			1,24	1,00
NH ₄ VO ₃	0,98	8,33			0,65	5,56
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,20	0,74			0,13	0,49
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,18	0,80			0,12	0,63
Outros Componentes	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
Hidrocortisona	0,23	0,64	0,04	0,10	0,09	0,24
Putrescina•2HCl	6,48	40,22	1,08	6,70	2,48	15,39
ácido linoleico	0,22	0,80	0,04	0,14	0,08	0,20

(continuação)

	Meio 1		Meio 2		Meio 3	
ácido tióctico	0,56	2,73	0,10	0,49	0,14	0,69
D-glucose (Dextrose)	18039,43	89107,92	6150,72	34170,64	11042,24	61345,76
PVA	2560,00		2400,00		2520,00	
Insulina	54,00		10,00		14,00	
Piruvato de Sódio	54,85	498,63	55,00	499,95	54,85	498,63

Resultados e Conclusões

A Figura 1 demonstra que a taxa de crescimento das células anti-GDF-8 foi semelhante em ambos os Meios 1 e Meio 2 nas experiências em frasco.

A Figura 2 demonstra que e, biorreactores, o Meio 1 apresentou um aumento significativo na densidade celular final e na viabilidade no Meio 3. O título final também aumentou significativamente, desde 551 mg/L para o processo de plataforma para 976 mg/L com o Meio 1 (resultados não apresentados). A temperatura foi modificada desde 37°C até 31°C no dia 5. Devido a um crescimento celular elevado inesperado, as culturas foram alimentadas diariamente após o dia 5 quer com 2% em volume de Meio 4 a 20X ou 3% em volume de Meio 4 a 16X. Assim, esta não é uma verdadeira experiência descontínua como originalmente pretendido. A asparagina e a tiamina foram suplementadas no meio de alimentação começando no dia 10.

No desenvolvimento de um meio descontínuo concentrado, é necessário ter em consideração várias possíveis

preocupações. Primeiro, os nutrientes concentrados podem demonstrar serem tóxicos para as células. Nos meios desenvolvidos neste Exemplo, todos os nutrientes e componentes foram determinados como estando abaixo dos limites de toxicidade (resultados não apresentados).

Em Segundo lugar, o meio do sistema descontínuo concentrado possui necessariamente uma osmolaridade superior aos meios não concentrados, que foi demonstrado possuírem efeitos prejudiciais ao crescimento celular e viabilidade. Este problema pode ser contornados baixando a quantidade de NaCl no meio de partida. Para além disso, os meios do sistema descontínuo concentrado contém níveis de glucose insuficientes para sustentar o crescimento durante o período de cultura inteiro. Assim, as culturas foram suplementadas diariamente após o dia 5 com uma alimentação de glucose.

Em terceiro lugar, a insulina e a glutamina são susceptíveis à degradação durante o período de cultura de 12 dias. Assim, a cultura foi suplementada com estes componentes adicionalmente à glucose.

Finalmente, o ferro irá precipitar na solução contendo concentrações elevadas de fosfato a pH elevado. Este problema pode ser contornado adicionando ferro no final do processo de preparação do meio, após o pH ter sido ajustado para um nível apropriado.

Exemplo 2: Desenvolvimento de meio de alimentação concentrado (Meio 5) para as células anti-GDF-8 num processo semi-contínuo.

No Exemplo 1, foi desenvolvido um processo descontínuo para cultivar células anti-GDF-8 utilizando o Meio 1. Devido à densidade celular elevada que resultou durante o processo, foi determinado que a suplementação de nutrientes em adição à glucose e glutamina foi ainda vantajosa. Todavia, suplementar o sistema descontínuo com o meio de alimentação Meio 4 a 8X resultaria na diluição excessiva da cultura. Foi desenvolvido um meio de alimentação mais concentrado de modo a contornar este problema.

Materiais e Métodos e Resultados

A Tabela 2 lista as composições do Meio 4A-1, Meio 4B, Trace B e Trace D utilizadas nas formulações das Tabelas 3-7.

Tabela 2. Composições do Meio 4A-1, Meio 4B, Oligo B e Oligo D utilizado nas formulações das Tabelas 3-7.

	Meio 4 ^a -1		Meio 4B		Oligo-elementos B		Oligo-elementos D	
Aminoácidos	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanina	17,80	0,20						
arginina	191,00	1,10						
asparagina•H ₂ O	135,00	0,90						

(continuação)

	Meio 4 ^a -1		Meio 4B		Oligo-elementos B		Oligo-elementos D	
ácido aspártico			68,50	0,50				
ácido glutâmico			29,40	0,20				
glicina	15,00	0,20						
histidina•HCl•H ₂ O	73,60	0,35						
isoleucina	118,00	0,90						
leucina	170,00	1,30						
lisina•HCl	182,00	1,00						
metionina	69,60	0,40						
fenilalanina	82,50	0,50						
prolina	69,00	0,60						
serina	158,00	1,60						
treonina	95,20	0,80						
triptofano	32,60	0,16						
tirosina•2Na•2H ₂ O			104,00	0,40				
valina	93,60	0,80						
Vitaminas	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	nM	mg/L	nM
biotina	0,41	1,68						
pantotenato de cálcio	4,50	9,45						
cloreto de colina	17,90	128,78						
ácido fólico			5,30	12,02				
Inositol	25,20	140,00						
nicotinamida	4,00	32,79						
piridoxina•HCl	4,10	19,90						
riboflavina	0,45	1,20						
tiamina•HCl	4,40	13,06						
vitamina B12	1,40	1,03						
Oligoelementos	µg/L	nM	mg/L	µM	µg/L	nM	µg/L	nM
(NH ₄) ₅ MoO ₄ •4H ₂ O					1,24	1,00		
CuSO ₄	0,43	2,69						
CuSO ₄ •5H ₂ O							7,49	30,00
FeSO ₄ •7H ₂ O							834	3000
MnSO ₄ •H ₂ O					0,17	1,01		

(continuação)

	Meio 4 ^a -1		Meio 4B		Oligo-elementos B		Oligo-elementos D	
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O					140,00	492,84		
NH ₄ VO ₃					0,65	5,56		
NiSO ₄ •6H ₂ O					0,13	0,49		
SnCl ₂ •2H ₂ O					0,12	0,53		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	230,00	801,38					863	3007
Outros Componentes	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
ácido linoleico			42,00	0,15				
ácido tióctico			105,00	0,51				
D-glucose (Dexose)			1000000	5555,56				

Meio 4 a 20X

O primeiro meio concentrado foi desenvolvido como o Meio 4 a 20X. A formulação do meio para o Meio 4 a 20X é proporcionada na Tabela 3.

Tabela 3. Quadro do meio de alimentação Meio 4 20X

Parte	Componente	Quantidade	Unidade
I	Meio 4A-1	31,120	g/L
	Nucellin™	40,000	ml/L
	H/P stock	20,000	ml/L
	Stock de Selenito	2,000	ml/L
	PVA	2,400	g/L
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,610	g/L
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,430	g/L
	Ácido aspártico	1,330	g/L
	Ácido glutâmico	0,588	g/L
	Ácido linoleico	0,840	ml/L
	Ácido tióctico	2,100	ml/L

(continuação)

Parte	Componente	Quantidade	Unidade
	Tirosina•2Na (Mw 225)	1,790	g/L
	1000X Oligo B	6,000	ml/L
	Glucose	100,000	g/L
	Glutamina	14,600	g/L
	pH a 7,0		
	Osmolaridade Registrada	1064,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Ad. 108 mL de Oligo D, 0,25 g FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 mL de Stock de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 mL de Ácido fólico a 6 mM	
Nota: Nucellin™ é preparada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); stock H/P = 0,036 mg/mL de hidrocortisona, 1,08 mg/mL de Putrescina•2HCl,			

A formulação do meio consiste em 3 partes: I, II, III. A Parte I é uma versão concentrada de Meio 4 a 8X com os componentes individuais de Meio 4B excepto ácido fólico devido às preocupações da solubilidade desta vitamina. A Parte II é stock de fotografia, Trace D e cisteína acídica, para evitar a possível precipitação do ferro se adicionado na parte I. A Parte III é um stock de ácido fólico. A Parte I é adicionada a 2% em volume diariamente com início no dia 5 e as partes II e III são adicionadas uma vez no dia 5 juntamente com a Parte I.

O pH final do meio de alimentação foi ajustado para 7,0 e a osmolaridade foi de cerca de 1064 mOsm. Uma alimentação de 2% resultará num aumento de 2 g/L glucose, de 2 mM de Glutamina e de 14 mOsm de osmolaridade para a cultura. 2. 16X Medium 4.

2. Meio 4 a 16X

Para reduzir o aumento da osmolaridade, o meio de alimentação foi alterado desde o Meio 4 a 20X (2% em volume diariamente) para o Meio 4 a 16X (3% em volume diariamente). A formulação dos meios para o Meio 4 a 16X é proporcionada na Tabela 4.

Tabela 4. Quadro do meio de alimentação Meio 4 16X

Parte	Componente	Quantidade	Unidade
I	Meio 4A-1	24,896	g/L
	Nucellin™	32,000	ml/L
	stock H/P	16,000	ml/L
	Stock de Selenito	1,600	ml/L
	PVA	2,400	g/L
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,088	g/L
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,344	g/L
	Ácido aspártico	1,064	g/L
	Ácido glutâmico	0,470	g/L
	Ácido linoleico	0,672	ml/L
	Ácido tióctico	1,680	ml/L
	Tirosina•2Na (Mw 225)	1,432	g/L
	1000X Oligo B	9,000	ml/L
	Glutamina	6,280	g/L
	pH a 7,0		
	Osmolaridade Registada	295,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Ad. 108 mL de Oligo D, 0,25 g de FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 mL de Stock de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 mL 6 mM Ácido fólico	
Nota: Nucellin™ é preparada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); stock H/P = 0,036 mg/mL de hidrocortisona, 1,08 mg/mL de Putrescina•2HCl,			

Neste Meio 4 a 16X modificado, a glucose foi também eliminada para reduzir ainda mais a osmolaridade e produziu alguma flexibilidade da alimentação de glucose. A osmolaridade total do meio de alimentação é agora 295 mOsm.

3. Meio 4 a 16X

Foram realizadas alterações na formulação do Meio 4 a 16X. Foi adicionada solução de stock de ferro na alimentação resultando numa adição de 0,45 μM a cada alimentação. Adicionalmente, a glucose foi de volta adicionada para produzir uma adição de 1,5 g/L a cada alimentação. A formulação do meio para este meio 4 modificado a 16X é proporcionada na Tabela 5.4.

Tabela 5. Quadro de meio de alimentação Meio 4 16X

Parte	Componente	Quantidade	Unidade
I	Meio 4A-1	24,896	g/L
	Nucellin™	32,000	mL/L
	stock H/P	16,000	mL/L
	Stock de Selenito	1,600	mL/L
	PVA	2,400	g/L
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,088	g/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,344	g/L
	Ácido aspártico	1,064	g/L
	Ácido glutâmico	0,470	g/L
	Ácido linoleico	0,672	mL/L
	Ácido tióctico	1,680	ml/L
	Tirosina•2Na (Mw 225)	1,432	g/L
	1000X Oligo B	9,000	mL/L
	Glucose	50,000	g/L

(continuação)

Parte	Componente	Quantidade	Unidade
	Glutamina	7,300	g/L
	pH to 7.0		
	FeSO ₄ •7H ₂ O (1 mM de stock)	15,000	mL/L
	Osmolaridade Registada	607,000	mOsm
II	Ácido fólico	720 ml 6 mM Ácido fólico	
III	Cisteína (400 mM)	Ad, 108 mL de Oligo D, 0,25 g FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 mL de Stock de Cisteína	
Nota: Nucellin™ é preparada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); stock H/P = 0,036 mg/mL de hidrocortisona, 1,08 mg/mL de Putrescina•2HCl,			

4. Meio 4 a 16X

Aqui, o meio de alimentação (Meio 4 a 16X) foi produzido em meio combinado em vez das 3 alimentações separadas como nos vários últimos sistemas descontínuos. Foram realizados testes para assegurar que o ácido fólico possa ser dissolvido na concentração necessária e que nem o ferro nem o ácido fólico precipitou da solução após armazenamento a 4°C ou à temperatura ambiente durante 6 dias. A formulação média para o Meio 4 a 16X combinado é proporcionada na Tabela 6.

Tabela 6. Quadro de meio de alimentação Meio 4 16X

Componente	Quantidade	Unidade
Meio 4A-1	24,896	g/L
Nucellin™	32,000	ml/L
Stock de H/P	16,000	ml/L
Stock de Selenito	1,600	ml/L
PVA	2,400	g/L
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,088	g/L

(continuação)

Componente	Quantidade	Unidade
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,344	g/L
Ácido aspártico	1,064	g/L
ácido glutâmico	0,470	g/L
Ácido linoleico	0,672	ml/L
Ácido tióctico	1,680	ml/L
Tirosina·2Na (Mw 225)	1,432	g/L
Glucose	66,700	g/L
Glutamina	7,300	g/L
Ácido fólico	70,560	mg/L
Cisteína acídica (400 mM)	6,250	ml/L
FeSO ₄ Stock (1 mM)	23,000	ml/L
1000x Oligo B	9,000	ml/L
1000x Oligo D	3,300	ml/L
pH esperado 6,11	Ajuste a 7,0	
Osmolaridade Registrada	724,000	mOsm
Nota: Nucellin™ é preparado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0,036 mg/mL hidrocortisona, 1,08 mg/mL Putrescina·2HCl.		

A osmolaridade final do meio é de 724 mOsm, com uma adição diária de glucose de 2 g/L e adição de glutamina de 1,5 mM.

5. Meio 4 a 12X.

Aqui, foram realizadas várias alterações para o meio de alimentação. Foi utilizado Meio 4B em pó em vez da adição de cada ingrediente individual no Meio 4B. O Meio 4B em pó foi misturado com glucose e dissolvido separadamente em condições básicas através da titulação da solução para pH 10,25. Foram adicionadas asparagina e tiamina adicionais, uma vez que os resultados da análise de aminoácidos e vitaminas demonstraram que estes dois componentes

tinham sido consumidos no final do processo semi-contínuo. A utilização do Meio 4 a 12X reduz ainda mais o aumento da osmolaridade quando alimentado à cultura. A formulação do meio para Meio 4 a 12X é proporcionada na Tabela 7.

Tabela 7. Quadro de meio de alimentação Meio 4 12X.

Componente	Quantidade	Unidade
Meio 4A-1	18,672	g/L
Nucellin™	24,000	mL/L
Stock H/P	12,000	mL/L
Stock de Selenito	1,200	mL/L
PVA	2,400	g/L
Asparagina.H ₂ O	1,620	g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,566	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,258	g/L
Glutamina	5,475	g/L
Tiamina	0,040	g/L
Meio 4B Pré-dissolvido & Glucose	~175	mL/L
Cisteína acidica (400 mM)	4,688	mL/L
pH Registrado		
Ajustar o pH para 7,2 com HCl a 5N		
Stock de FeSO ₄ (1 mM)	17,250	mL/L
1000x Oligo B	6,750	mL/L
1000x Oligo D	2,475	mL/L
pH Registrado (esperado 7,18)		
Osm Registrado	566,000	
Meio 4B Pré-dissolvido & Glucose * (para 1L de meio de alimentação)		
Água	150 mL	
Mistura de Meio 4B (14,5 g) com glucose (38,3 g)	Adicionado em	
Ajustar o pH utilizando NaOH 25% até estar dissolvido (pH cerca de 10,25)		
Nota: Nucellin™ é preparado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); H/P stock = 0,036 mg/mL hidrocortisona, 1,08 mg/mL Putrescina·2HCl.		

A osmolaridade final é 566 mOsm. Um fornecimento diário de 4% em volume produz um aumento de osmolaridade aproximado de 8,6, um aumento em glucose de 2 g/L e um aumento de glutamina de 1,5 mM. A formulação do meio do Meio 4 a 12X é também conhecida como Meio 5. O Meio 5 é fácil de preparar em comparação com Meio 4 a 20X ou Meio 4 a 16X, e estável ao longo de 10 dias quer à temperatura ambiente ou a 4°C (resultados não apresentados).

Exemplo 3: Processo semi-contínuo com privação de Glutamina para cultura celular anti-GDF-8

As células CHO requerem glutamina no meio de partida para sobreviver. Tradicionalmente, os níveis iniciais de glutamina são elevados e a glutamina é fornecida diariamente após o dia 5 até ao fim do processo semi-contínuo. Os processos semi-contínuos tradicionais resultam normalmente em níveis de lactato e níveis de amónio elevados nas culturas celulares, que são conhecidos por possuir efeitos inibidores no crescimento celular, na densidade celular e na expressão da proteína recombinante. Os processos semi-contínuos nos quais a glucose é adicionada lentamente a uma cultura demonstraram baixar a produção de lactato e aumentar o crescimento celular, a densidade celular e a expressão da proteína recombinante.

Todavia, os métodos anteriores na técnica para a manipulação da adição de glucose não são práticos para o fabrico em grande escala. Neste caso, utilizando meios de cultura com níveis iniciais de glutamina mais baixos e eliminando a glutamina do fornecimento de nutrientes, é demonstrado que são produzidos níveis mais baixos de amónio e lactato, conduzindo ao aumento da viabilidade celular. Adicionalmente, em culturas com privação de glutamina, a expressão da proteína recombinante é aumentada e a osmolaridade final é reduzida.

Materiais e Métodos

ESTIRPES E MEIOS: foram cultivadas células anti-GDF-8 de um modo semi-contínuo em Meio 1 num Biorreactor de 1 L.

CONDIÇÕES DE CULTURA: as células foram cultivadas durante doze dias em Biorreactores de 1L. A temperatura foi mudada de 37°C para 31°C no dia 4 ou dia 5, dependendo do crescimento celular. Foram testados três processos semi-contínuos: um processo normal (controlo), um processo de alimentação sem glutamina e um processo com privação de glutamina. Detalhes pertinentes destes processos estão listados na Tabela 8 e na Tabela 9.

Tabela 8. Processo semi-contínuo em Biorreactores de 1 L sem processo de alimentação com glutamina.

	Processo de Controlo	Sem processo de alimentação de glutamina
Glutamina (mM) no meio inicial	13 mM	13 mM
Adição de Glutamina	5 mM no Dia 4	Sem adição de glutamina
Meio de alimentação	Meio 5 (com 37,5 mM de glutamina)	Meio 5 sem glutamina
Esquema de Alimentação	4% diariamente a partir do Dia 5	4% diariamente a partir do Dia 5
Mudança de Temperatura para 31°C	Dia 4	Dia 5

Tabela 9. Processo em sistema semi-contínuo em Biorreactores de 1 L com processo de privação de glutamina

	Processo de Controlo	Processo de baixa glutamina
Glutamina (mM) no meio inicial	13 mM	4 mM
Adição de Glutamina	5 mM no Dia 4	Sem adição de glutamina
Meio de alimentação	Meio 5 (com 37,5 mM de glutamina)	Meio 5 sem glutamina
Esquema de Alimentação	4% diariamente a partir do Dia 5	4% diariamente a partir do Dia 5
Mudança de Temperatura para 31°C	Dia 4	Dia 5

ANÁLISE DA AMOSTRA: Foram retiradas amostras diárias das culturas e foram analisadas quanto à densidade celular, viabilidade celular, lactato, glutamina, e níveis

de amónio. O título de anticorpo anti-GDF-8 expresso foi também medido diariamente.

Resultados e Conclusões

A Figura 3 apresenta a densidade celular das culturas crescidas em condições sem glutamina ou semi-contínuas de controlo. Em ambos os casos, a densidade celular foi semelhante ao longo da experiência.

A Figura 4 apresenta a percentagem de viabilidade celular em culturas cultivadas em condições sem glutamina ou semi-contínuas de controlo. A cultura de alimentação sem glutamina apresentou uma viabilidade celular marcadamente superior para o final da experiência, começando no dia 6.

A Figura 5 apresenta níveis de amónio em culturas crescidas quer em condições sem alimentação de glutamina ou semi-contínuas de controlo. A cultura sem alimentação de glutamina apresentou uma diminuição acentuada nos níveis de amónio para o final da experiência, começando no dia 4.

A Figura 6 apresenta níveis de lactato em culturas crescidas quer em condições sem alimentação de glutamina ou semi-contínuas de controlo. Os níveis de lactato foram ligeiramente inferiores na cultura de alimentação sem glutamina ao longo da experiência.

A Figura 7 apresenta título de anticorpo anti-GDF-8 em culturas cultivadas quer em condições sem glutamina ou semi-contínuas de controlo. O título final de anticorpo anti-GDF-8 foi superior na cultura sem alimentação de glutamina.

A Figura 8 apresenta a densidade celular de culturas cultivadas quer em condições de privação de glutamina quer em condições semi-contínuas de controlo. Em ambos os casos, a densidade celular foi semelhante ao longo da experiência.

A Figura 9 apresenta viabilidade celular em culturas cultivadas quer em condições de privação de glutamina quer em condições semi-contínuas de controlo. Em ambos os casos, a densidade celular foi semelhante ao longo da experiência.

A Figura 10 apresenta níveis de amónio em culturas cultivadas quer em condições de privação de glutamina quer em condições semi-contínuas de controlo. A cultura com privação de glutamina apresentou uma diminuição acentuada nos níveis de amónio ao longo da experiência.

A Figura 11 apresenta níveis de lactato em culturas cultivadas quer em condições de privação de glutamina quer em condições semi-contínuas de controlo. A cultura com privação de glutamina apresentou uma diminuição

acentuada nos níveis de lactato para o final da experiência, começando no dia 4.

A Figura 12 apresenta título de anticorpo anti-GDF-8 em culturas quer em condições de privação de glutamina quer em condições semi-contínuas de controlo. O título de anticorpo final de anti-GDF-8 foi superior na cultura com privação de glutamina.

Colectivamente, estes resultados indicam que os níveis de glutamina diminuídos são benéficos para as culturas através da redução da quantidade da produção de amónio, aumentando a viabilidade celular e aumentando o título de anticorpo anti-GDF-8 expresso. Adicionalmente, nas culturas privadas de glutamina, foram observados níveis baixos de lactato, possivelmente devido à diminuição na taxa de consumo de glucose. Os níveis de amónio e de lactato diminuídos também possuem o efeito de reduzir a osmolaridade total. A osmolaridade elevada é também conhecida por possuir efeitos inibidores no crescimento e viabilidade celulares. Níveis iniciais baixos de glutamina juntamente com a eliminação da alimentação de glutamina também possuem o efeito positivo de reduzir o amónio produzido como resultado da degradação não enzimática da glutamina em meios armazenados. E eliminação da glutamina no fornecimento de nutrientes também simplifica o processo de cultura de células anti-GDF-8.

Exemplo 4. Resposta à dose de células anti-GDF-8 em Meio 1 e Meio 2.

O Meio 1 é muito mais concentrado em nutrientes do que o Meio 2. Os níveis óptimos de ferro para o crescimento celular em Meio 1 foram determinados de modo a evitar problemas com deficiência em ferro durante a cultura celular.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas em placas para uma passagem em Meio 1 ou em Meio 2. As concentrações de ferro destes meios foram manipuladas por adição de quantidades diferentes de solução stock de ferro. As densidades celulares finais foram medidas por CEDEX.

Resultados e Conclusão

A Figura 13 apresenta a resposta a dose de Fe de células anti-GDF-8 em Meio 1 e Meio 2 contendo diferentes concentrações de ferro. No Meio 2, a densidade celular foi relativamente constante para concentrações de ferro que variam desde 3 μM até 15 μM . Em Meio 1, a densidade celular aumenta com a concentração crescente de ferro, mas atinge um máximo após aproximadamente 5 μM . Esta diferença deve ser devida ao teor elevado de nutrientes em Meio 1, que pode reduzir a disponibilidade de ferro para as células, como uma consequência da quelação de ferro nos meios. Estes

resultados indicam que os níveis de ferro devem ser mantidos acima dos 5 μM para evitar problemas com a deficiência em ferro no Meio 1.

Exemplo 5. Substituição de Glutamato por Glutamina no Processo de Biorreactor.

Foram realizadas três experiências para testar os efeitos da substituição de glutamato por glutamina num processo de cultura de células anti-Lewis Y.

Materiais e Métodos

As experiências foram realizadas em biorreactores de 10 L a pH 7,1, oxigénio a 30% dissolvido, e uma temperatura de iniciação de 37°C com uma mudança para 31°C no dia 5. Os gases disseminados e no espaço sem meio do reactor foram de 88% de uma mistura de 93% de ar/7% de CO₂ e 12% de oxigénio. O meio de partida em todas as experiências foi o Meio 1, que contém glutamina. O meio de alimentação e o horário da alimentação incluindo as alimentações suplementares de glucose e glutamina são apresentados na Tabela 10. As colunas marcadas com "Glutamato" foram alimentadas com Meio 5 modificado, não contendo glutamina, mas contendo uma concentração molar de glutamato igual à concentração molar de glutamina em Meio 5 convencional. As colunas marcadas com glutamina foram alimentadas com Meio 5 convencional.

Tabela 10. Esquema de alimentação.

Dia	9040-44		9040-56		9040-64	
	Glutamato 1	Glutamina 1	Glutamato 2	Glutamina 2	Glutamato 3	Glutamina 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM de gln		5 mM de gln	3 g/L de glue3	7,7 mM de gln 2,9g/l gluc
5	3,6 g/ gluc	5 mM de gln 5,5 g/L gluc	3,5 g/L gluc	5 mM de gln 6 g/L de gluc	3 g/L de gluc	3 g/L de gluc
6	12% de Meio 4 16X	12% de Meio 4 16X	17% Meio 5	17% de Meio 4 16X	29% de Meio 5	29% de Meio 5
7		4 mM de gln				
8						
9		2,5 g/L de glue				
10	10% de Meio 4 16X	10% de Meio 4 16X	8% Meio 5	5% de Meio 4 16X		
11		1 g/L de gluc				
12						
13		1 g/L de gluc				

Resultados e Conclusões

Em cada experiência, a densidade celular é semelhante à apresentada na Figura 14. As densidades celulares são baixas nas experiências Glutamina 2 e Glutamato 2 devido a um desvio de pH para cerca de 6,7 no

dia 3 do processo. A queda de densidade entre os dias 6 e 7 nas experiências Glutamina 3 e Glutamato 3 é devida aos 29% de alimentação de meio no dia 6.

A Figura 15 apresenta a viabilidade celular das culturas alimentadas com glutamato e glutamina. As viabilidades permaneceram mais elevadas durante a segunda metade do processo nos biorreactores contendo culturas alimentadas com glutamato.

Na Experiência 1, o título anti-Lewis Y é semelhante entre as culturas alimentadas com glutamato e glutamina. A Figura 16 demonstra que nas Experiências 2 e 3, os títulos anti-Lewis Y são inferiores nos reactores alimentados com glutamina. Os títulos anti-Lewis Y inferiores observados nestes reactores podem ser devidos aos níveis elevados de lactato produzidos, como apresentado na Figura 17.

Os biorreactores operados com glutamato no meio de alimentação possuem uma concentração de amónio inferior (Figura 18) e uma osmolaridade inferior (Figura 19).

O ensaio de ELISA de ligação foi utilizado para testar a actividade das amostras a partir das experiências Glutamina 1 e Glutamato 1. As actividades foram semelhantes: 110% de referência para a amostra de Glutamina 1 e 122% de referência para a amostra de Glutamato 1 (resultados não apresentados).

A substituição do glutamato por glutamina nestas experiências não tem um efeito significativo na densidade celular. Todavia, a viabilidade celular é inferior nos Biorreactores alimentados com glutamina. Amónio, lactato e osmolaridade são inferiores nos Biorreactores alimentados com glutamato em comparação com aqueles alimentados com glutamina. Em média, o título anti-Lewis Y é mais elevado nos Biorreactores alimentados com glutamato e a actividade é essencialmente igual em ambas as condições.

Exemplo 6. Substituição de Glucose e Glutamina no Processo de Cultura Celular Anti-Lewis Y.

O propósito desta experiência foi testar os efeitos da substituição de glucose e glutamina com os meios de alimentação listados na Tabela 11 a seguir na cultura de células Y anti-Lewis (ver Bogheart et al., "Antibody targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts", *Clin. Can. Res.* 10:4538-49 (2004)). Foram medidos a densidade celular, a viabilidade celular, título anti-Lewis Y e níveis de amónio.

Materiais e Métodos

A experiência foi efectuada em frascos de agitação de 250 mL com um volume inicial de 75 mL. Todos os

frascos de agitação foram semeados a $0,25 \times 10$ células/mL no Meio 2. Os frascos foram incubados a 37°C numa incubadora de CO_2 a 7% durante 14 dias. Nos dias 3 e 4, os frascos foram alimentados com 5% do volume de Meio de alimentação Meio 6. A composição do Meio 6 está listada na Tabela 11. Nos dias 5-13 os frascos foram alimentados com 5% em volume de uma das soluções de alimentação listadas na Tabela 12. Cada condição foi efectuada em duplicado. As amostras foram retiradas diariamente para contagem de células por CEDEX e ensaios para amónio, glucose, e lactato

Tabela 11. Composição do Meio 6.

Aminoácidos	mg/L	mM	Oligoelementos	µg/L	nM
alanina	142,48	1,60	Selenito de Sódio	40,00	231,35
arginina	1528,84	8,79	CuSO_4	3,44	21,51
asparagina• H_2O	1080,60	7,20	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7,49	30,00
ácido aspártico	532,40	4,00	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2534	9115
cistina• 2HCl	473,00	1,51	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2704	9421
ácido glutâmico	235,38	1,60	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,17	1,01
glutamina	4820,00	33,01	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	140	492,84
glicina	120,07	1,60	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,24	1,00
histidina• $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	588,32	2,80	NH_4VO_3	0,65	5,56
isoleucina	944,52	7,21	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,13	0,49
leucina	1360,75	10,39	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12	0,53
lisina• HCl	1456,80	8,00	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,20	4,97
metionina	477,06	3,20	AgNO_3	0,17	1,00
fenilalanina	660,36	4,00	$\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	2,55	9,98
prolina	552,31	4,80	KBr	0,12	1,01
serina	1264,70	12,04	$\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	2,28	9,99
treonina	762,02	6,40	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,38	10,00
triptofano	260,94	1,28	CrCl_3	0,32	2,02

(continuação)

Aminoácidos	mg/L	mM	Oligoelementos	µg/L	nM
tirosina•2Na•2H ₂ O	832,62	3,19	NaF	4,20	100,02
valina	749,21	6,40	GeO ₂	0,53	5,07
			KI	0,17	1,02
Vitaminas	mg/L	mM	RbCl	1,21	10,01
biotina	3,28	0,01	ZrOCl ₂ •8H ₂ O	3,22	9,99
Pantotenato de cálcio	36,02	0,08			
cloreto de colina	143,28	1,03	Outros Componentes	µg/L	nM
ácido fólico	42,43	0,10	Hidro cortisona	288	0,79
inositol	201,71	1,12	Putreseina•2HCl	8000	49,66
nicotinamida	32,02	0,26	ácido linoleico	336,25	1,20
piridoxina•HCl	32,82	0,16	ácido tióctico	840,63	4,08
riboflavina	3,60	0,01			
tiamina•HCl	35,22	0,10	Outros Componentes	mg/L	mM
vitamina B12	11,21	0,01	D-glucose (Dextrose)	33005,99	183,37
			PVA	2400,00	
KH ₂ PO ₄	1635,00	12,02			
MgSO ₄ •7H ₂ O	171,98	0,70			

Tabela 12. Adições nos dias 5-13. Meio 6 modificado sem conter glucose ou glutamina.

GluGln	Meio 6 Modificado + 43 g/L glucose + 4,82 g/L de glutamina (controle)
Glu	Meio 6 Modificado + 43 g/L glucose + 4,82 g/L glutamato
GluAsp	Meio 6 Modificado + 43 g/L glucose + 4,36 g/L asparagina
GluGlyGln	Meio 6 Modificado + 43 g/L glucose + 6,71 g/L glicilglutamina
GluGlu	Meio 6 Modificado + 43 g/L galactose + 4,82 g/L glutamina
GalGlu	Meio 6 Modificado + 43 g/L galactose + 4,82 g/L glutamato
GalGln	Meio 6 Modificado + 43 g/L galactose + 4,36 g/L asparagina
GalGlyGln	Meio 6 Modificado + 43 g/L galactose + 6,71 g/L glicilglutamina
GalAsp	Meio 6 + 43 g/L glucose

Resultados e Conclusões

A maior densidade celular foi observada quando o glutamato ou glicilglutamina foi substituído por glutamina na presença de glucose ou galactose nos meios de alimentação. A densidade celular foi geralmente inferior nas culturas alimentadas com glucose/glutamina, galactose/glutamina, ou apenas glucose (Figura 20). A viabilidade final foi superior nas culturas alimentadas com apenas glucose, seguidas pelas culturas alimentadas com glucose/glutamato. A menor viabilidade foi observada nas culturas alimentadas com glutamina ou asparagina combinadas com glucose ou galactose (Figura 21).

No dia 14 o título foi superior nas culturas alimentadas com glucose/glicilglutamina e glucose/glutamato em cerca de 700 µg/mL. O título foi menor nas culturas alimentadas com galactose/glicilglutamina e galactose/asparagina em cerca de 500 µg/mL. O título no controlo de glucose/glutamina foi cerca de 570 µg/mL (Figura 22).

Os menores níveis de amónio foram observados nos frascos alimentados com glucose/glutamato ou apenas glucose. Os frascos alimentados com galactose/glutamato, glucose/glutamina, glucose/glicilglutamina, e glucose/asparagina apresentaram níveis intermédios de amónio. Os frascos alimentados com galactose/asparagina, galactose/glicilglutamina, e galactose/glutamina tinham os maiores níveis de amónio (Figura 23).

Os níveis de glucose permaneceram acima de 1 g/L em todos os frascos alimentados com galactose até ao dia 11. Do dia 11 ao dia 14, a glucose nestas culturas não foi nunca completamente consumida, permanecendo entre 0,6 e 1 g/L, sem diferenças significativas entre as diferentes culturas.

Os níveis de glucose aumentaram em todos os frascos alimentados com glucose ou glucose combinada com outro substrato até ao dia 10. Do dia 10 ao dia 14 nestas culturas, os níveis de glucose permaneceram praticamente constantes e semelhantes um ao outro. No dia 14, cerca de 8,4 g/L de glucose permaneceram nas culturas alimentadas com glucose/glutamato e cerca de 10,8 g/L de glucose permaneceu nas culturas alimentadas apenas com glucose.

Os níveis de lactato atingiram um valor de cerca de 2,4 g/L no dia 5, quando as condições foram as mesmas para todas as células, e caíram essencialmente para zero em todas as culturas no dia 14. Os níveis de lactato foram superiores do dia 10 ao dia 14 no controlo de glucose/glutamina, mas estavam abaixo de 1 g/L durante esta altura (dados não apresentados).

Todas as condições testadas nesta experiência resultaram numa densidade celular mais elevada do que o controlo da condição de glucose/glutamina. Todas as condições testadas excepto a condição de galactose/aspargina resultaram numa viabilidade final mais elevada do que no controlo de glucose/glutamina ou a condição de

adição de galactose/glutamina. O título no controlo de glucose/glutamina foi cerca de 570 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com um maior de cerca de 700 $\mu\text{g/mL}$ na condição de adição de glucose/glicilglutamina e a condição de adição de glucose/glutamato.

Exemplo 7. Avaliação de um Processo de Sistema Descontínuo de Jejum de Glutamina para a Produção de anti-GDF-8.

Os típicos métodos de produção em sistema semi-contínuo requerem múltiplas adições ao longo do período da cultura. Estas adições são concebidas para substituir os nutrientes no Meio que podem ser consumidos pelas células ou se podem ter degradado durante o sistema descontínuo. Estas adições criam complicações quando se aumenta a escala do processo para ser utilizada em grandes reactores, tal como a necessidade para propulsão (ver Figura 24). Para além disso, as adições diluem a quantidade de anti-GDF-8 já segregada na cultura e deste modo afecta o título na colheita. A utilização de um processo em sistema descontínuo permitirá a inoculação do biorreactor com todo o volume, em vez de um volume parcial de modo a acomodar as adições, que removerão a necessidade de um propulsor que reduz amplamente qualquer efeito de diluição na produtividade.

A glutamina é uma das razões mais importantes para utilizar uma abordagem de sistema semi-contínuo uma vez que não é estável a 37°C e pensou-se que teria que ser

reabastecido durante uma cultura descontínua. Contudo, os resultados dos Exemplos 2, 5, e 6, em que foi testada uma estratégia de jejum de glutamina, apresentou um aumento significativo na produtividade em comparação com um reactor de controlo que com alimento de glutamina. Este resultado foi combinado com o processo descontínuo para criar o processo descontínuo de jejum de glutamina que foi testado neste Exemplo.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas em Biorreactores de 1 L durante 12 dias de acordo com as quatro condições de crescimento que se seguem. Os parâmetros do Biorreactor para todas as condições foram mantidos os mesmos. O oxigénio dissolvido foi mantido a não mais do que 23% de saturação de ar por injeção de ar e o pH foi mantido a 7,00 pela adição de uma solução contendo bicarbonato de sódio a 0,58 M e carbonato de sódio a 0,71 M. As temperatura de todas as culturas foi mantida a 37°C durante os primeiros quatro dias do sistema descontínuo. No quarto dia do sistema descontínuo a temperatura de todos os biorreactores foi diminuída para 31°C e mantida neste ponto para a duração do sistema descontínuo. As culturas controlo e de sistema semi-contínuo foram alimentadas com 8%, 12%, e 8% do volume total do reactor dos seus respectivos meios de alimentação nos dias 5, 7, e 10, respectivamente.

1) Controlo.

- Meio de inoculação Meio 7 (ver Tabela 13).
- Meio 8 de alimentação, alimentado aos dias 5, 7, e 10 (ver Tabela 13).
- Adição de 5 mM de glutamina no dia 4.
- Abaixamento da temperatura para 31°C no dia 4.

2) Sistema semi-contínuo com jejum de glutamina.

- Meio de Inoculação Meio 7 com apenas 4 mM de glutamina (ver Tabela 13).
- Alimentação com Meio 8 sem glutamina, alimentado aos dias 5, 7, e 10 (ver Tabela 13).
- Sem adição de glutamina no dia 4.
- Abaixamento da temperatura para 31°C no dia 4.

3) Sistema descontínuo com jejum de glutamina.

- Meio de inoculação novo Meio de sistema descontínuo com apenas 4 mM de glutamina (ver Tabela 13).
- Sem Meio de Alimentação.
- Sem adição de glutamina.
- Abaixamento de temperatura para 31°C no dia 4.
- Adicionar 5g/L de glucose no dia 8.

4) Sistema descontínuo de jejum de glutamina suplementado no dia 8.

- Meio de inoculação novo Meio de sistema descontínuo com apenas 4 mM de glutamina (ver Tabela 13).

- Meio de inoculação novo meio de sistema descontínuo com apenas 4 mM de glutamina (ver Tabela 13).
- Sem meio de alimentação.
- Sem adição de glutamina.
- Abaixamento da temperatura para 31°C no dia 4.
- Adicionar 4 g de glucose, 375 mg de Asparagina, 3 mL de 1 mM de stock de FeSO₄, 3,33 mL de stock de 5 g/L de Nucellin™, 2,57 mL de 36 mg/L de Hidrocortisona e 1,0 g/L de solução stock de Putrescina, 0,23 mL de 50 mg/L de stock de Selenito de Sódio, e 13,1 mg de Tiamina no dia 8.

Tabela 13. Composições dos meios utilizados.

	MW	Meio 7	Meio 8	Meios Descontínuos
Aminoácidos		mM	mM	mM
L -Alanina	89,0	1,08	2,4	0,2
L- Arginina	174,0	6,84	13,2	4
L-Asparagina•H ₂ O	150,0	4,76	21,4	7,5
L-Ácido Aspártico	133,0	2,40	6	1,65
L-Cisteína•HCl• H ₂ O	176,0	0,40	0	0,4
L-Cistina•2HCl	313	0,95	1,875	1
L-Ácido glutâmico	147,0	1,08	2,4	1,08
L-Glutamina	146,0	13,00	37,5	4
Glicina	75,0	1,28	2,4	1,54
L-Histidina•HCl•H ₂ O	210,0	1,76	4,2	1,76
L-isoleucina	131,0	4,76	10,8	2,83
L-leucina	131,0	6,52	15,8	4,7
Lisina•HCl	182,0	5,20	12	5,2
L-Metionina	149,0	1,96	4,8	2,6
L-fenilalanina	165,0	2,60	6	2,2
L-prolina	115,0	3,24	7,2	4,1

(continuação)

	MW	Meio 7	Meio 8	Meios Descontínuos
L-serina	105,0	8,60	18	8,6
L-treonina	118,0	4,32	9,6	3,2
L-triptofano	204,0	0,78	1,92	1,04
L-tirosina 2Na•2H ₂ O	281,0	2,18	4,8	1,75
L-valina	117,0	4,32	9,6	4
Vitaminas		µM	µM	µM
Biotina	244,0	8,31	20,4	11
D-Pantotenato de Cálcio	476,0	46,06	112,8	46,06
Cloreto de colina	139,0	632,2	1548	840
ácido fólico	441,0	58,8	144	58,8
I-inositol	180,0	686	1680	911
nicotinamida	122,0	161,7	396	215
piridoxina•HCl	206,0	88,15	240	88
piridoxal•HCl	203,0	10	0	10
riboflavina	376,0	5,37	13,2	1,1
tiamina•HCl	337,0	63,7	274,7	117
vitamina B12	1355,0	4,9	12	7,8
Sais Inorgânicos				
NaCl	58,5	18,8 mM		
KCl	74,6	4,2 mM		4,19 mM
CaCl ₂	111	1,05 mM		1,05 mM
Selenito de Sódio	173	27 µg/L	60 µg/L	60 µg/L
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	142	4,68 mM	11 mM	4,68 mM
Na ₂ HPO ₄	138	0,5 mM		0,3986 mM
MgSO ₄	120	1,15 mM	1,05 mM	1,15 mM
MgCl ₂	95	0,3 mM		0,3 mM
FeSO ₄ •7H ₂ O	278	9 µM	24,675 µM	9 µM
Fe (NO ₃) ₃ •9H ₂ O	404	0,125 µM		0,124 µM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	287	9,2 µM	17 µM	9,2 µM
CuSO ₄	160	0,05	0,074	0,064 µM
NaHCO ₃	84	23,8 mM		23,8 mM

(continuação)

	MW	Meio 7	Meio 8	Meios Descontínuos
Biotina	244,0	8,31	20,4	11
Outros				
Glucose	180	16 g/L	38,3 g/L	15 g/L
Álcool Polivinílico		2,56 g/L	2,4g/L	2,56 g/L
Hidrocortisona	363	0,23 mg/L	0,43 mg/L	0,28 mg/L
Putrescina•2HCl	161	6,4 mg/L	12 mg/L	7,7 mg/L
Piruvato de sódio	110	500		500
ácido linoleico	280	0,81	1,8	0,81
ácido tióctico	206	2,7	6	2,7
Nucellin™		54 mg/L	120 mg/L	50 mg/L
1000x Oligo B		1,5 mL/L	6,75 mL/L	1,5 mL/L

Resultados e Conclusões

O crescimento celular para os primeiros 4 dias foi semelhante para os processos de controlo e de sistema descontínuo, enquanto o processo de sistema semi-contínuo com jejum de glutamina possuíam uma densidade celular ligeiramente inferior e permaneceram um pouco abaixo do resto do sistema descontínuo. Ambos os processos em sistema descontínuo mantiveram densidades celulares elevadas para a duração do sistema contínuo, provavelmente devido à ausência de qualquer diluição significativa (ver Figura 25). As viabilidades de todas as culturas foram as mesmas até ao dia 8. Contudo, é interessante notar que no dia 11, a viabilidade do processo em sistema descontínuo que não

foi suplementado foi inferior à dos outros três biorreactores e terminou significativamente mais baixa pelo final do dia. Isto sugere que o Meio do sistema descontínuo pode ainda ser optimizado uma vez que o processo em sistema descontínuo suplementado possui uma viabilidade que foi o mesmo dos biorreactores do sistema semi-contínuo (ver Figura 26).

As células cultivadas no processo de sistema descontínuo de jejum de glutamina ou no sistema semi-contínuo de jejum de glutamina superou as mesmas células cultivadas no processo de controlo do sistema semi-contínuo na produtividade. O processo de controlo do sistema semi-contínuo possui um título no dia da colheita de 685 µg/mL, como esperado, enquanto o processo semi-contínuo com jejum de glutamina possuía um título na recolha de 1080 µg/mL, cerca de 58% superior ao controlo. Isto é semelhante aos resultados observados previamente. O processo do sistema descontínuo com privação de glutamina não-suplementada possuíam um título no dia da recolha de 960 µg/mL, 40% superior ao controlo, semelhante ao do processo semi-contínuo com jejum de glutamina, enquanto o de sistema descontínuo com jejum de glutamina suplementado possuía o maior título de 1296 µg/mL. Isto é um aumento de 89% em relação ao controlo (ver Figura 27).

Quando os níveis inibidores para as quatro condições foram analisados os resultados mostraram que os

níveis de lactato e de amónio para todos os três processos de jejum de glutamina foram significativamente inferiores ao do controlo. De facto, após o dia 4, essas três condições interromperam a produção ou começaram o consumo de lactato enquanto o controlo continuou para produzir lactato durante o sistema descontínuo (ver Figura 28). Como esperado, os níveis de amónio foram muito inferiores nos processos com jejum de glutamina e diminuíram após o dia 4, enquanto o controlo continuou a produzir amónio (ver Figura 29).

Neste Exemplo, a combinação de um processo descontínuo com uma estratégia de jejum de glutamina resultou num melhoramento em 40% da produtividade em relação ao controlo do processo semi-contínuo para as células anti-GDF-8. Os dados também sugerem que com alguma optimização do Meio descontínuo, pode ser obtido um melhoramento em quase duas vezes na produtividade. Este melhoramento na produtividade pode ser atribuído a dois factores. Primeiro, o jejum em glutamina aumenta a produtividade directamente ou mantendo os níveis de amónio e níveis de lactato muito baixos. Segundo, devido à ausência de alimentações, o título não é diluído durante o descontínuo. A produtividade aumentada em conjunto com a facilidade de operação inerente num processo descontínuo torna esta uma opção atractiva para produção de polipéptidos recombinantes.

Exemplo 8. Efeitos das concentrações de Glutamina e Asparagina nos meios descontínuos no processo de cultura celular de anti-GDF-8.

Nos Exemplos 2, 5 e 6, foi demonstrado que o jejum para glutamina conferiu benefícios em culturas semi-contínuas de duas linhas de células, incluindo o aumento do crescimento celular, viabilidade celular e título assim como a diminuição da produção de lactato e amónio. A asparagina também parece desempenhar um papel nos meios descontínuos.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas durante doze dias em Biorreactores de 1 L em Meio 9 modificado com diferentes concentrações de glutamina e asparagina. A composição base do Meio 9 é listada na Tabela 14. as variações experimentais nesta composição de base são listadas na Tabela 15. As culturas foram incubadas a 37°C durante os primeiros 5 dias com a excepção do Reactor 4, cuja temperatura foi 30°C para o primeiro dia devido a problemas de controlo de temperatura. As culturas foram deslocadas para 31°C no dia 6. No dia 7, as culturas foram alimentadas uma vez com 5% em volume de Meio 5 sem glutamina. As culturas foram medidas diariamente para a densidade celular, título anti-GDF-8, níveis de lactato e amónio.

Tabela 14. Composição do Meio 9.

Aminoácidos	mg/L	mM	Oligoelementos	µg/L	nM
alanina	17,80	0,20	Selenito de sódio	69,16	400,00
arginina	696,00	4,00	Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	50,00	123,76
asparagina•H ₂ O	3000,00	20,00	CuSO ₄	10,24	64,00
ácido aspártico	219,45	1,65	CuSO ₄ •5H ₂ O	99,88	400,00
cisteína•HCl•H ₂ O	70,40	0,40	FeSO ₄ •7H ₂ O	4170	15000
cisteína•2HCl	468,75	1,50	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2640	9200
Glutamato monossódico	33,80	0,20	MnSO ₄ •H ₂ O	33,80	200,00
glutamina	584,00	4,00	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	284,07	1000
glicina	115,50	1,54	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	247,20	200,00
histidina•HCl•H ₂ O	474,60	2,26	NH ₄ VO ₃	2,34	20,00
isoleucina	570,73	4,36	NiSO ₄ •6H ₂ O	5,26	20,00
leucina	1030,70	7,87	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,90	4,00
lisina•HCl	1401,40	7,70	AlCl ₃ •6H ₂ O	0,97	4,00
metionina	387,40	2,60	KBr	0,48	4,00
fenilalanina	507,00	3,07	CrCl ₃	15,83	100,00
prolina	539,50	4,69	NaF	0,17	4,00
serina	1052,00	10,02	GeO ₂	0,42	4,00
treonina	56,80	4,75	KI	33,20	200,00
triptofano	274,16	1,34	RbCl	0,48	4,00
tirosina•2Na•2H ₂ O	745,75	2,86	H ₃ BO ₃	12,37	200,00
valina	749,00	6,40	LiCl	0,17	4,00
Vitaminas	mg/L	mM	Outros Componentes	µg/L	nM
biotina	2,68	0,01	Hidrocortisona	540,00	1,49
pantotenato de cálcio	21,92	0,05	Putrescina•2HCl	15000	93,11
cloreto de colina	158,46	1,14	ácido linoleico	290,00	1,04
Ácido fólico	25,93	0,06	Ácido tioóctico	716,00	3,48
inositol	163,98	0,91			
nicotinamida	26,23	0,22	Outros Componentes	mg/L	mM
piridoxal•HCl	2,03	0,01	D-glucose (Dextrose)	15000,00	83,33
piridoxina•HCl	36,13	0,18	PVA	2560,00	

(continuação)

Aminoácidos	mg/L	mM	Oligoelementos	µg/L	nM
riboflavina	2,41	0,01	Nucellin™	50,00	
tiamina•HCl	39,43	0,12	Piruvato de Sódio	55,00	0,50
vitamina B12	21,17	0,02			
Sais Inorgânicos	mg/L	mM			
CaCl ₂	116,55	1,05			
KCl	312,90	4,19			
Na ₂ HPO ₄	58,60	0,40			
NaCl	1100,00	18,80			
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	645,84	4,68			
MgSO ₄	138,00	1,15			
MgCl ₂	28,50	0,30			
NaHCO ₃	2000,00	23,81			

Tabela 15. Condições testadas de Glutamina e Asparagina.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Linha de células	anti-GDF-8					
Meios	Meios descontínuos (Meio 9)					
Níveis de Glutamina	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Níveis de Asparagina	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
Densidade da Sementeira (x10 ⁶ /mL)	0,3 a 0,35					
Meios de adição	Meio 5-Glutamina, a 5% no Dia 7					
Cultura Dias	12					
Deslocamento de Temperatura (37-31°C)	Dia 6	Dia 6	Dia 6	Dia 5	Dia 5	Dia 4

Resultados e Conclusões

As Figuras 30, 31, 32 e 33 apresentam o crescimento celular de células anti-GDF-8, anti-GDF-8 título, níveis de lactato e níveis de amónio, respectivamente,

durante as experiências sob as várias condições experimentais.

Sob todas as condições experimentais, 4 mM de glutamina é melhor do que 1 mM de glutamina em todos os níveis de Asparagina testados. A níveis de glutamina comparáveis, condições de 12 mM e 20 mM de asparagina são melhores do que condições de 8 mM de asparagina. O lactato diminuído e os níveis de MH_4 foram observados no final da cultura para todas as condições testadas.

Exemplo 9. Efeitos das concentrações de Glutamina e Asparagina em meios descontínuos no processo de cultura celular de anti-GDF-8.

No Exemplo 8, foi demonstrado que o Meio 9 contendo uma concentração inicial de 4 mM de glutamina tem um melhor desempenho do que os meios contendo 1 mM de glutamina, independentemente dos níveis de asparagina. Este exemplo demonstra o efeito de meios contendo 13 mM os níveis de glutamina e vários níveis de asparagina.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas durante doze dias em Biorreactores de 1 L no Meio 9 modificado com diferentes concentrações de glutamina e asparagina conforme listado na Tabela 16. As culturas foram incubadas a 37°C durante os primeiros 3 dias. As culturas foram então deslocadas a 31°C no dia 4. No dia 7, as culturas foram

alimentadas uma vez com 5% em volume de Meio 5 sem glutamina. As culturas foram medidas diariamente para a densidade celular, viabilidade celular, lactato, níveis de amónio e níveis de glutamina, título de anti-GDF-8, e osmolaridade.

Tabela 16. Condições testadas de Glutamina e Asparagina.

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Linha de células	anti-GDF-8					
Meios	Meios descontínuos (Meio 9)					
Níveis de Glutamina	4 mM	4 mM	13mM	13 mM	13 mM	13 mM
Níveis de Asparagina	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8mM
Densidade de sementeira ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,3 a 0,35					
Meios de adição	Meio 5 sem glutamina, 5% no Dia 7					
Dias de Cultura	12					
Deslocação de Temperatura (37-31°C)	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4

Resultados e Conclusões

As Figuras 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40 mostram o crescimento celular de células anti-GDF-8, percentagem de viabilidade de células anti-GDF-8, níveis de lactato, níveis de amónio, os níveis de glutamina, título de anti-GDF-8, e osmolaridade, respectivamente, durante as experiências sob as várias condições experimentais.

Entre todas as condições testadas, apenas o meio Meio 9 contendo 13 mM de glutamina e 20 mM de asparagina apresentou significativos efeitos adversos no crescimento

celular e título. A glutamina é consumida em todas as culturas aproximadamente ao mesmo tempo, independentemente de se a cultura começa com 4 mM ou 13 mM de glutamina. O maior título de anti-GDF-8 é obtido em culturas que contêm 13 mM de glutamina e 12 mM de asparagina. Todas as condições de cultura exibem níveis diminuídos de lactato e de amónio próximo do final da cultura. Os níveis de amónio foram maiores na cultura contendo 13 mM de glutamina e 20 mM de asparagina.

Exemplo 10. O efeito dos níveis de asparagina e cisteína no decréscimo observado nos níveis de lactato e amónio em células anti-GDF-8 cultivadas em Meio 9.

Nos Exemplos 2, 5 e 6, verificou-se que as culturas cultivadas sob condições de privação de glutamina exibiram níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura. Contudo, as culturas cultivadas no Meio 9 sob condições de não jejum de glutamina exibia ainda níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura. Este efeito não foi observado em outros meios tais como o Meio 1, em que o jejum de glutamina parece necessário para os níveis diminuídos de lactato e amónio. O Meio 9 e o Meio 1 diferem nos níveis de asparagina (20 mM no Meio9 versus 11 mM total no Meio 1 mais aditivos) e cistina acídica (1,5 mM no Meio 9 versus 0,95 mM no Meio 1). Este exemplo testa se estes dois componentes foram responsáveis pelo decréscimo observado nos níveis de lactato e de amónio no final da cultura.

Meios	Gln (mM)	Asn (mM)	Total Gln (mM)	Total Asn (mM)	Adição	
					Meio 5, 30%	
Meio 1	13	5	29	11	do total	Gln a 5 mM, dia 4
					Meio 5-Gln,	
Meio 1	4	5	4	11	30% do total	
Meios descontínuos (Meio 9)	4	20	4	21	Meio 5-Gln, 5% dia 7	
Meio 1+ 5 mM Asn + 0,5 mM Cisteína					Meio 5, 30%	
	13	10	29	16	do total	Gln a 5 mM, dia 4
					Meio 5, 30%	
Meios descontínuos (Meio 9)	13	20	29	21	do total	Gln a 5 mM, dia 4

Nota: Meio 5-Gln = Meio 5 sem glutamina.

Resultados e Conclusões

As células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 9 exibiram níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura, independentemente de se as culturas foram iniciadas com 4 mM ou 13 mM de glutamina (ver Figuras 42 e 43). Em contraste, o Meio 1 exibiu apenas níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura quando as culturas foram iniciadas com 4 mM de glutamina (ver Figuras 42 e 43). A adição de asparagina e cistina extra ao Meio 1 contendo 13 mM de glutamina não resultaram em níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura (ver Figuras 42 e 43).

As culturas que exibiram níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura (Meio 1 com 4 mM de glutamina, Meio 9 com 4 mM de glutamina e Meio 9 com 13 mM de glutamina) foram também observados para ter uma osmolaridade total inferior no final do processo de cultura (ver Figura 47).

O Meio 9 com 4 mM de glutamina exibiu o título mais elevado de anti-GDF-8, seguido por Meio 9 com 13 mM de glutamina adicionado no dia 4 (ver Figura 46). Tendo em conta o efeito da diluição do adicionado, o Meio 9 contendo 4 mM de glutamina tinha um título equivalente ao de anti-GDF-8 no Meio 9 contendo 13 mM de glutamina.

Exemplo 11. O efeito dos níveis de aminoácidos e vitaminas nos decréscimos observados nos níveis de lactato e amónio em células anti-GDF-8 cultivadas em Meio 9.

O Exemplo 10 testou se as diferenças nos níveis de asparagina e cisteína entre o Meio 1 e o Meio9 foram responsáveis pelos decréscimos observados nos níveis de lactato e amónio no final do processo de cultura no Meio 9 que não esteve em jejum para a glutamina. Foi determinado que estes factores não foram responsáveis pelo decréscimo observado. O Meio 1 e o Meio 9 também diferem nas suas concentrações em aminoácidos e vitamina. Este exemplo testa se as diferenças nas concentrações de aminoácidos e vitaminas entre estes dois meios são responsáveis pelo decréscimo observado.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas em Biorreactores de 1 L durante 12 dias. As células foram inicialmente cultivadas a 37°C e foram deslocadas para 31°C no dia 4 a $8-10 \times 10^6$ /mL. A Tabela 18 lista as várias condições experimentais testadas. Os aminoácidos, vitaminas, hidrocortisona e putrescina, oligoelementos E (composição listada na Tabela 19) e ferro foram adicionados às várias condições experimentais do Meio 1 de modo que os níveis destes componentes foram iguais aos níveis no Meio

Tabela 18. Condições testadas de aminoácidos e vitaminas.

Meios	Gln (mM)	Asn (mM)	Adição	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 11
Meio 1	13	5	Meio 5 30% total, Gln 5 a mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	Meio 5 a 8%	
Meio 1 + AA	13	15	Meio 5 30% total, Gln 5 a mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12	Meio 5 a 8%	
Meio 1+Vit, H/P, E, Fe	13	5	Meio 5 30% total, Gln 5 a mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12	Meio 5 a 8%	4g/L glucose
Meio 1 + todos	13	15	Meio 5 30% total, Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12	Meio 5 a 8%	4g/L glucose
Meio 9 com Gln a 13 mM	13	20	Meio 5 30% total, Gln 5 a mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12	Meio 5 a 8%	

Nota: AA = Aminoácidos, H/P: = 0,036 mg/mL hidrocortisona, 1,08 mg/mL Putrescina·2HCl, E: Oligoelementos E.

Tabela 19: Composição de Oligoelementos E.

Oligoelementos	µg/L	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	123,60	100,00
AlCl ₃ •6H ₂ O	0,48	2,00
H ₃ BO ₃	6,18	100,00
CrCl ₃	7,92	50,00
CuSO ₄ •5H ₂ O	49,94	200,00
GeO ₂	0,21	2,00
KBr	0,24	2,00
KI	16,60	100,00
LiCl	0,08	2,00
MnSO ₄ •H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	142,03	500,00
NaF	0,08	2,00
NH ₄ VO ₃	1,17	10,00
NiSO ₄ •6H ₂ O	2,63	10,00
RbCl	0,24	2,00
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,45	2,00
Selenito de sódio	34,58	200,00

Resultados e Conclusões

Todas as condições testadas exibiram níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura excepto para o Meio 1 contendo aminoácidos adicionados, indicando que os níveis de aminoácidos aumentados no Meio 9 em comparação com o Meio 1 não são provavelmente responsáveis pela diminuição nos níveis de lactato e amónio (ver Figuras 49 e 50). Contudo, o Meio 1 contendo vitaminas, hidro cortisona e putrescina adicionados, os oligoelementos E e o ferro exibiram níveis de

lactato e amónio inferiores no final do processo de cultura em comparação com o Meio 1 contendo aminoácidos adicionados (ver Figuras 49 e 50). Isto indica que estes componentes podem ser responsáveis pela diminuição observada no Meio 9.

As culturas cultivadas no Meio 1 contendo vitaminas, hidrocortisona e putrescina adicionados, os oligoelementos E e ferro exibiram os níveis mais baixos de amónio ao longo da experiência devido às inferiores quantidades de asparagina e glutamina totais nos meios iniciais (ver Figura 50).

Exemplo 12. O efeito da vitamina, oligoelementos E e níveis de ferro nos decréscimos observados nos níveis de lactato e amónio em células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 9.

No Exemplo 11, foi determinado que os níveis aumentados de vitaminas, hidrocortisona e putrescina, oligoelementos E e ferro no Meio 9 relativamente ao Meio 1 pode ser responsável pelo decréscimo nos níveis de lactato e amónio observados no final do processo de cultura. Aqui, estes componentes foram testados individualmente e em combinação para determinar qual, se algum, foi responsável pelos decréscimos observados.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas em Biorreactores de 1 L durante 12 dias. As células foram

inicialmente cultivadas a 37°C e foram deslocadas a 31°C no dia 4 a $8-10 \times 10^6$ células/mL, com a exceção de que o Meio 1 contém oligoelementos E, que foi deslocado para o dia 4 a cerca de 6×10^6 células/mL. A Tabela 20 lista as várias condições experimentais testadas. A hidrocortisona e a putrescina foram adicionadas a todas as condições do Meio 1 de modo que os níveis destes componentes foram iguais aos níveis no Meio 9. As vitaminas, oligoelementos E (composição listada na Tabela 19) e ferro foram adicionados às várias condições experimentais do Meio 1 de modo que os níveis destes componentes foram iguais aos níveis no Meio 9. As amostras foram retiradas diariamente e guardadas para análise ao título através de HPLC Proteína A.

Tabela 20. Condições de aminoácidos e vitaminas testadas.

Meios	Gln (mM)	Asn (mM)	Adição	Desloc. Temp	Dia 4	Dia 6	Dia 7	Dia 10
Meio 1+Fe	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8% Meio
Meio 1+E	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8% Meio
Meio 1+Vit	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8% Meio
Meio 1+Fe+E	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8% Meio

(continuação)

Meios	Gln (mM)	Asn (mM)	Adição	Desloc. Temp	Dia 4	Dia 6	Dia 7	Dia 10
Meio 1+Fe+Vit	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8%
Meio 1+E+Vit	13	15	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8%
Meio 9 com 13 mM de Gln	13	20	Meio 5 30% do total	dia 4	Gln a 5 mM, dia 4	Meio 5 a 8%	Meio 5 a 12%	8%
Nota: E: Oligoelementos E.								

Resultados e Conclusões

De todas as condições testadas, apenas o Meio 9 contendo 13 mM de glutamina e o Meio 1 contendo os oligoelementos E exibiram níveis diminuídos de lactato e amónio no final do processo de cultura (ver Figuras 54 e 55). Deve ser notado que os níveis diminuídos observados para o Meio 1 contendo os oligoelementos E podem ser devidos ao facto de que esta cultura foi deslocada de temperatura quando as células foram a cerca de 6×10^6 células/mL.

O Meio 9 contendo 13 mM de glutamina exibiu um título de anti-GDF-8 maior do que qualquer uma das formulações do Meio 1.

Exemplo 13. Comparação de Meios 1, 3 e 9 no crescimento celular e título anti-GDF-8.

Materiais e Métodos

Tabela 21. Meios e condições de adição testados.

			Adição						
Meios	Asn	Gln	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 10	Dia 11
Meio 3	14 mM	4 mM	Meio 5- Gln3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 10%	Meio 5- Gln3.3%	Meio 5- Gln a 3,3%
Meio 3	14 mM	4 mM	Meio 5- Gln3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln 10%	Meio 5- Gln 3.3%	Meio 5- Gln a 3,3%
Meio 1	14 mM	4 mM			Meio 5- Gln 8%		Meio5- Gln 12%	Meio5- Gln 8%	
Meio 9	20 mM	4 mM				Meio 5- Gln 5%			

Nota: Meio 5-Gln - Meio 5 sem glutamina.

Tabela 22. Sumário dos Meios

Meio	Asn	Gln	Adição	AA(Inicial)/(Total)	Ião/ AA Total
Meio 3	14 mM	4 mM	Meio 5-Gln a 34%	34 mM/84mM	1,75
Meio 9	20 mM	4 mM	Meio 5-Gln a 5%	91,4 mM/94,3 mM	0,72
Meio 1	14 mM	4 mM	Meio 5-Gln a 31,6%	78 mM/96,4 mM	0,74
Nota: Meio 5-Gln - Meio 5 sem glutamina.					

Resultados e Conclusões

As células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 9 exibiram a densidade celular e título anti-GDF-8 mais elevados, enquanto as células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 3 exibiam a menor densidade celular e título de anti-GDF-8 (ver Figuras 57 e 58). O facto de que o Meio 9 produz resultados superiores aos do Meio 1 indica que é melhor do que proporcionar os componentes dos meios no meio inicial do que suplementá-los através de adições múltiplas. Adicionalmente, o facto de que o Meio 1 e o Meio 9 têm melhor desempenho do que o Meio 3 indica que proporcionar aminoácidos em concentrações superiores a cerca de 70 mM proporciona resultados superiores do que proporcionar aminoácidos em concentrações inferiores a cerca de 70 mM. Finalmente, proporcionar os aminoácidos em concentrações superiores a cerca de 70 mM nos resultados dos meios iniciais nas maiores densidades de células e títulos (comparar Meio 9 vs. Meio 1).

Exemplo 14. Análise estatística dos níveis óptimos de glutamina e asparagina total no Meio 9 para cultura celular de anti-GDF-8 em Biorreactores.

Materiais e Métodos

As células anti-GDF-8 foram cultivadas em Biorreactores de 1 L e foram deslocados de 37°C a 31°C nos dias indicados na Tabela 23. Os títulos finais foram sujeitos a um teste t de modo a determinar o nível óptimo de glutamina isolado e o nível óptimo de glutamina e asparagina totais combinada. A Tabela 23 sumariza algumas condições experimentais relevantes e resultados finais para células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 9.

Tabela 23. Condições experimentais relevantes e resultados finais para células anti-GDF-8 cultivadas no Meio 9.

Meios	Gln (mM)	Asn (mM)	Dia de mudança	Alimento	Título (µg/mL)	Título/ 1200	Gln Total	Asn Total	Total
Meio 9	1	8	6	Meio 5- Gln a 5%	615,2	0,51	1	9	
Meio 9	1	8	6	Meio 5- Gln a 5%	857,1	0,71	4	9	
Meio 9	1	12	6	Meio 5- Gln a 5%	947	0,79	1	13	
Meio 9	4	12	4	Meio 5- Gln a 5%	1184	0,99	4	13	
Meio 9	4	20	4	Meio 5- Gln a 5%	769,6	0,64	1	21	
Meio 9	4	8	6	Meio 5- Gln a 5%	1262,6	1,05	13	9	
Meio 9	4	20	4	Meio 5- Gln a 5%	1198	1,00	4	21	

Resultados e Conclusões.

A Figura 59 apresenta títulos anti-GDF-8 extrapolados para vários níveis de glutamina isolada e glutamina e asparagina total combinadas. A Tabela 24 apresenta os resultados de um teste t para comparar o título normalizado dos níveis de glutamina entre 2 e 15 mM e os níveis de glutamina fora deste intervalo. A Tabela 25 apresenta os resultados de um teste t para comparar o título normalizado dos níveis de glutamina e asparagina combinadas entre 16 e 36 mM e níveis de glutamina e asparagina combinadas fora deste intervalo.

Ambos os resultados do teste t indicaram diferenças significativas nos títulos de anti-GDF-8 entre os dois grupos que foram comparados. As culturas cultivadas no Meio 9 contendo entre 2 e 15 mM de glutamina e entre 16 e 36 mM de glutamina e asparagina combinadas exibiram títulos mais elevados de anti-GDF-8 do que as culturas cultivadas em meios com glutamina e níveis de glutamina e asparagina combinados que caem fora destes intervalos. Em todas as experiências, os níveis de asparagina foram superiores a 9 mM.

Tabela 24. Resultados do teste t para comparar o título normalizado das condições 2 mM<Gln<15 mM versus Gln>15 mM, Gln<2 mM

Título Normalizado	Gln>15, Gln <2	2<Gln<15
Média	0,724649917	1,033147493
Variância	0,013326655	0,036834109
Observações	7	12
Variância misturada	0,028537361	
Diferença com a Hipótese da Média	0	
df	17	
t Stat	-3,839791986	
P(T<=t) uma cauda	0,000656219	
t Crítico uma cauda	1,739608432	
P(T<=t) duas caudas	0,001312438	
t Crítico duas caudas	2,109818524	

Tabela 25. Resultados do teste t em comparação com o título normalizado de 16 mM<Gln+Asn<36 mM versus Gln+Asn>36 mM, Gln+Asn<16mM

Título Normalizado	Asn+Gln>36, Asn+Gln<16	16<Asn+Gln<38
Média	0,735066584	1,027071104
Variância	0,012061148	0,041504987
Observações	7	12
Variância misturada	0,031113044	
Diferença com a Hipótese da Média	0	
df	17	
t Stat	-3,480816823	
P(T<=t) uma cauda	0,001430281	
t Crítico uma cauda	1,739606432	
P(T<=t) duas caudas	0,002860561	
t Crítico duas caudas	2,109818524	

Exemplo 15. Efeitos do Meio na Cultura celular.

Este exemplo investigou o desempenho de três variações no meio de cultura celular na escala intermédia utilizando culturas de sementeira com densidade elevada. Esperava-se que todos os meios testados apresentassem melhoramentos no meio da Fase 1 (Meio 10 alimentado com meio alimentado com Meio 11), com base em resultados no biorreactor de pequena escala.

Materiais e Métodos

As células CHO que expressam um anticorpo monoclonal IgG1 humanizados anti-péptido Abeta ("células anti-ABeta") foram testadas em vários meios, como apresentado na Tabela 26 (ver Basi *et al.*, Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide, W002/46237). O pH da extremidade baixa estabelecido foi de 7,0 controlado com 0,95 M de Na_2CO_3 + 0,05M K_2CO_3 , excepto para a Fase 1, que foi controlado com uma solução contendo bicarbonato de sódio a 0,58 M e carbonato de sódio a 0,71 M. O oxigénio dissolvido foi controlado a 30% introduzindo ar conforme necessário, a agitação foi a 60 rpm, e o Meio introduzido foi Meio 5 (com ou sem glutamina, conforme notado). Todas as culturas foram cultivadas numa escala de 130 L excepto para 03P49B501, que foi cultivado a uma escala de 500 L. Resumidamente, o Meio 1 é enriquecido em todos os nutri-

Tabela 27. Composições dos Meios 10,11 e 12.

	Meio 10		Meio 11		Meio 12	
Aminoácidos	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
alanina	24,87	0,28	142,48	1,60	17,80	0,20
arginina	423,43	2,43	1528,84	8,79	696,00	4,00
asparagina•H ₂ O	173,90	1,16	1080,60	7,20	1500,00	10,00
ácido aspártico	52,72	0,40	532,40	4,00	219,45	1,65
cisteína•HCl•H ₂ O	70,01	0,40			70,40	0,40
cisteína•2HCl	62,09	0,20	470,00	1,50	312,50	1,00
ácido glutâmico	41,08	0,28	235,38	1,60		
glutamato monossódico					33,80	0,20
glutamina	1162,40	7,96	6000,00	41,10	584,00	4,00
glicina	35,92	0,48	120,07	1,60	115,50	1,54
histidina•HCl•H ₂ O	75,27	0,36	588,32	2,80	369,60	1,76
isoleucina	151,90	1,16	944,52	7,21	370,73	2,83
leucina	172,69	1,32	1360,75	10,39	615,70	4,70
lisina•HCl	218,38	1,20	1456,80	8,00	946,40	5,20
metionina	53,55	0,36	477,06	3,20	387,40	2,60
fenilalanina	98,81	0,60	660,36	4,00	363,00	2,20
prolina	96,40	0,84	552,31	4,80	471,50	4,10
serina	273,07	2,60	1264,70	12,04	903,00	8,60
treonina	132,81	1,12	762,02	6,40	380,80	3,20
triptofano	28,99	0,14	260,94	1,28	212,16	1,04
tirosina•2Na•2H ₂ O	145,10	0,56	832,62	3,19	456,75	1,75
valina	131,17	1,12	749,21	6,40	468,00	4,00
Vitaminas	mg/L	µM	mg/L	µM	mg/L	µM
biotina	0,36	1,49	3,28	13,45	2,68	11,00
pantotenato de cálcio	4,03	8,47	36,02	75,67	21,93	46,06
Cloreto de colina	16,11	115,92	143,28	1030	116,76	840,00
ácido fólico	4,76	10,80	42,43	96,22	25,93	58,80

(continuação)

	Meio 10		Meio 11		Meio 12	
inositol	22,64	125,79	201,71	1120	163,98	911,00
nicotinamida	3,61	29,62	32,02	262,44	26,23	215,00
piridoxal•HCl	1,99	9,83			2,03	10,00
piridoxina•HCl	1,67	8,10	32,82	159,31	18,13	88,00
riboflavina	0,40	1,06	3,60	9,58	0,41	1,10
tiamina•HCl	3,92	11,64	35,22	104,51	39,43	117,00
vitamina B12	1,34	0,99	11,21	8,27	10,57	7,80
Sais Inorgânicos	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
CaCl ₂	115,78	1,04	113,27	1,02	116,55	1,05
KCl	310,94	4,17			312,90	4,19
KH ₂ PO ₄			1640,00	12,06		
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50			56,60	0,40
NaCl	3704,96	63,44				
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	114,53	0,83			645,84	4,68
MgSO ₄	48,70	0,41			138,00	1,15
MgSO ₄ •7H ₂ O	8,60	0,03	170,00	0,69		
MgCl ₂	28,53	0,30			28,50	0,30
NaHCO ₃	1220,00	14,52			2000,00	23,81
Oligoelementos	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
Selenito de Sódio	7,00	40,49	40,00	231,35	53,65	310,27
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49,86	123,42			50,00	123,76
CuSO ₄	0,97	6,06	3,44	21,51	10,00	62,50
CuSO ₄ •5H ₂ O	7,49	30,00	7,49	30,00	49,94	200,00
FeSO ₄ •7H ₂ O	1542	5549	2534	9115	3366	12000
ZnSO ₄ •7H ₂ O	1383	4821	2704	9421	2640	9198
MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	1,01	0,17	1,01	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140	492,84	140,00	492,84	142,03	500,00
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,24	1,00	1,24	1,00	123,60	100,00
NH ₄ VO ₃	0,65	5,56	0,65	5,56	1,17	10,00
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	0,49	0,13	0,49	2,63	10,00
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,12	0,53	0,12	0,53	0,45	2,00

(continuação)

	Meio 10		Meio 11		Meio 12	
AlCl ₃ •6H ₂ O			1,20	4,97	0,48	2,00
AgNO ₃			0,17	1,00		
Ba (C ₂ H ₃ O ₂) ₂			2,55	9,98		
KBr			,12	1,01	0,24	2,00
CdCl ₂ •2,5H ₂ O			2,28	9,99		
CoCl ₂ •6H ₂ O			2,38	10,00		
CrCl ₃			0,32	2,02	7,92	50,00
NaF			4,20	100,02	0,08	2,00
GeO ₂			0,53	5,07	0,21	2,00
KI			0,17	1,02	16,60	100
RbCl			1,21	10,01	0,24	2,00
ZrOCl ₂ •8H ₂ O			3,22	9,99		
H ₃ BO ₃					6,18	100,00
LiCl					0,08	2,00
Outros Componentes	µg/L	µM	µg/L	µM	µg/L	µM
hidrocortisona	86,40	,24	288,00	0,79	360,00	0,99
putrescina•2HCl	2480	15,39	8000	49,66	10000	62,07
Ácido linoleico	56,69	0,20	336,25	1,20	290,00	1,04
ácido tióico	141,71	0,69	840,63	4,08	716,00	3,48
D-glucose (Dextrose)	11042,24	61,35	43005,99	238,92	15000,00	83,33
PVA	2520,00		2400,00		2560,00	
Nucellin™	14,00		80,00		50,00	
Piruvato de Sódio	54,85	0,50			55,00	0,50

Resultados e Conclusões

As alterações do meio levam a um melhoramento estabilizado durante estas experiências. Em termos de crescimento celular, viabilidade, níveis de lactato reduzidos, níveis de amônio reduzidos, e título, os níveis de glutamina reduzidos foram melhores do que os elevados (ver Figuras 60-64) e o meio equilibrado (descontínuo) foi

melhor do que meio rico (Meio 1, ver Figuras 60-64). As culturas que começaram a partir de um inóculo de elevada densidade exibiram um título final superior do que as culturas que começaram a partir de inóculos com densidades inferiores (ver Figura 64).

Ao contrário do observado em biorreactores de pequena escala, o primeiro meio (Meio 1 com Gln elevada) resultou em títulos inferiores aos do processo original (ver Figura 64). Também não se verificou deslocamento para a incorporação de lactato após a alteração de temperatura (ver Figura 62). Isto sugere que pode existir alguma sensibilidade de escala com este meio. Esta conclusão é apoiada por processamentos paralelos em pequena-escala (2L) que foram efectuados em simultâneo com estas experiências de escala intermédia (dados não apresentados). As formulações do último meio contendo menos glutamina não foram sensíveis à escala, pelo menos, nestas experiências (ver Figuras 60-65). Os processos em duplicado (Culturas 2 e 3 e Culturas 5 e 6) apresentam uma muito boa reprodutibilidade de processamento a processamento (ver Figuras 60-65), aumentando a confiança em todos os dados produzidos nesta campanha.

Exemplo 16. Produção de TNFR-Ig utilizando Meio 9.

Materiais e Métodos

As células CHO que expressam uma proteína de

fusão dimérica consistindo na porção extracelular de ligação a ligando receptor do factor de necrose de tumor humano de 75 quilodalton (p75) (TNFR) ligado à porção Fc de IgG1 ("células TNFR-Ig") foram semeadas a uma densidade elevada a partir de um biorreactor de perfusão e diluídas para 3×10^6 de células viáveis/mL em Meio 9 para o passo de produção em biorreactor.

Resultados e Conclusões

As Figuras 66, 67, 68, 69, 70, 71 e 72 apresentam crescimento celular, viabilidade celular, glucose residual, os níveis de glutamina, concentração de lactato, concentração de amónio, e título relativo do produto, respectivamente. Sob o intervalo de modificações mínimas ao processo, todas as condições produziram bom crescimento celular, elevada viabilidade celular, e elevado título final global.

Para todas as condições desta experiência, o produto colateral inibidor metabólico lactato foi ou consumido, ou a concentração estabilizada, sugerindo que a produção de lactato foi bloqueada. Do mesmo modo, para o metabolito inibidor amónio, os níveis sobem inicialmente, mas ao mesmo tempo após deslocamento da temperatura, o amónio começou a ser consumido pelas células. Neste Exemplo, as culturas celulares de TNFR-Ig foram sujeitas aos indutores químicos butirato de sódio, e HMBA.

Exemplo 17. Comparação de Condições de Cultura e Larga e Pequena Escala

Materiais e Métodos

Para determinar se o tamanho da cultura afectou características de cultura relevantes, as células anti-GDF-8 foram cultivadas em biorreactores de pequena escala de 1 litro ou biorreactores de larga escala de 6000 litros. As células foram cultivadas a 37°C e deslocadas para 31°C no dia 4.

Resultados e Conclusões

Como pode ser observado nas Figuras 73, 74, 75 e 76 (que apresentam densidade celular, título, níveis de lactato e níveis de amónio, respectivamente), não existiram diferenças relevantes entre as culturas de 6000 litros de larga escala e 1 litro de pequena escala para estas características. Ambos os níveis de lactato e amónio começaram a decrescer após o deslocamento da temperatura no dia 4. Este exemplo demonstra que o tamanho da cultura não afecta a densidade celular, viabilidade celular, níveis de lactato e níveis de amónio quando as culturas são sujeitas às mesmas condições de crescimento.

Lisboa, 15 de Abril de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de uma proteína de fusão factor de necrose de tumor-região Fc de imunoglobulina (TNFR-Fc) numa produção em larga escala em cultura celular compreendendo os passos de:

proporcionar a cultura celular compreendendo:

células de mamíferos que contêm um gene que codifica TNFR-Fc, gene que é expresso sob condições de cultura de células; e

um meio contendo glutamina e possuindo uma característica do meio seleccionada do grupo consistindo em:

(i) uma quantidade aminoácidos cumulativos por unidade de volume superior a cerca de 70 mM, (ii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para asparagina cumulativa inferior a cerca de 2,

(iii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para aminoácidos totais cumulativos inferior a cerca de 0,2,

(iv) uma proporção molar de ião inorgânico cumulativo para aminoácidos cumulativos entre cerca de 0,4 a 1,

(v) uma quantidade cumulativa combinada de glutamina e asparagina por unidade de volume superior a cerca de 16 mM, e suas combinações;

manutenção da referida cultura numa fase inicial de crescimento sob um primeiro conjunto de condições de cultura durante um primeiro período de tempo suficiente para permitir que as referidas células se reproduzam densidade celular viável num intervalo de cerca de 20%-80% da densidade celular viável máxima possível se a referida cultura foi mantida sob o primeiro conjunto de condições de cultura;

alteração de, pelo menos, uma das condições de cultura, de modo que um segundo conjunto de condições de cultura é aplicado;

manutenção da referida cultura durante um segundo período de tempo sob o segundo conjunto de condições e durante um segundo período de tempo de modo que TNFR-Fc se acumula na cultura celular.

2. Método da reivindicação 1, em que o referido meio contém uma proporção molar de glutamina cumulativa para asparagina cumulativa inferior a cerca de 2; e o referido meio possui duas características do meio seleccionadas do grupo consistindo em: (i) um meio contendo quantidade de aminoácidos cumulativos por unidade de volume superior a cerca de 70 mM, (iii) uma proporção molar de glutamina cumulativa para aminoácidos totais cumulativos inferior a cerca de 0,2, (iv) uma proporção molar de ião inorgânico cumulativo para aminoácidos totais cumulativos entre cerca de 0,4 a 1, (v) uma quantidade cumulativa combinada de glutamina e asparagina por unidade de volume superior a cerca de 16 mM, e suas combinações.

3. Método da reivindicação 1, em que a referida condição da cultura celular na referida alteração de pelo menos um passo das condições de cultura é seleccionada do grupo consistindo em: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolaridade, (iv) nível de indução química, e suas combinações.

4. Método da reivindicação 1, em que a concentração inicial de glutamina do referido meio é inferior a ou igual a 10 mM.

5. Método da reivindicação 1, em que a concentração inicial de glutamina do referido meio é inferior a ou igual a 4 mM.

6. Método da reivindicação 1, em que a quantidade cumulativa total por unidade de volume de glutamina do referido meio é inferior a ou igual a 10 mM.

7. Método da reivindicação 1, em que a quantidade cumulativa total por unidade de volume de glutamina do referido meio é inferior a ou igual a 4 mM.

8. Método da reivindicação 1, em que glutamina é apenas proporcionada no meio inicial no início da cultura celular.

9. Método da reivindicação 1, em que a densi-

dade inicial das referidas células de mamíferos é, pelo menos, 2×10^5 células/mL.

10. Método da reivindicação 1, em que a densidade inicial das referidas células de mamíferos é, pelo menos, 2×10^6 células/mL.

11. Método da reivindicação 1, em que o passo de proporcionar compreende proporcionar, pelo menos, cerca de 1000 L de uma cultura.

12. Método da reivindicação 1, em que o passo de proporcionar compreende proporcionar, pelo menos, cerca de 10 000 L de uma cultura.

13. Método da reivindicação 1, em que o referido primeiro conjunto de condições compreende um primeiro intervalo de temperatura que é aproximadamente 30 a 42 graus Celsius.

14. Método da reivindicação 1, em que o referido primeiro conjunto de condições compreende um primeiro intervalo de temperatura que é aproximadamente 37 graus Celsius.

15. Método da reivindicação 1, em que o referido conjunto de condições compreende um segundo intervalo de temperatura que é aproximadamente 25 a 41 graus Celsius.

16. Método da reivindicação 1, em que o referido conjunto de condições compreende um segundo intervalo de temperatura que é aproximadamente 29 a 35 graus Celsius.

17. Método da reivindicação 1, em que o referido conjunto de condições compreende um segundo intervalo de temperatura que é aproximadamente 31 graus Celsius.

18. Método da reivindicação 1, compreendendo ainda um segundo passo de alteração subsequente à primeira referida alteração, a alteração de, pelo menos, uma das condições de cultura, compreendendo pelo menos, uma das condições de cultura, de modo que um terceiro conjunto de condições é aplicado à cultura.

19. Método da reivindicação 18, em que o segundo passo de alteração compreende a alteração de, pelo menos, uma condição de cultura seleccionada do grupo consistindo em: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalidade, (iv) nível de químico indutor, e suas combinações.

20. Método da reivindicação 18, em que o referido terceiro conjunto de condições compreende um terceiro intervalo de temperaturas que é aproximadamente 27 a 37 graus Celsius.

21. Método da reivindicação 1, em que o referido primeiro período de tempo é entre 1-7 dias.

22. Método da reivindicação 1, em que o referido primeiro período de tempo é aproximadamente 4 dias.

23. Método da reivindicação 1, em que o total do referido primeiro período de tempo e do referido segundo período de tempo é, pelo menos, 5 dias.

24. Método da reivindicação 1, em que no passo de manutenção da referida cultura durante um segundo período de tempo, o nível de lactato diminui subsequente ao nível de lactato na cultura atingindo um nível máximo de.

25. Método da reivindicação 1, em que no passo de manutenção da referida cultura durante um segundo período de tempo, o nível de amónio diminui subsequente ao nível de amónio na cultura atingindo um nível máximo.

26. Método da reivindicação 1, em que a referida quantidade total do referido TNFR-Fc produzido é, pelo menos, 1,5 vezes superior à quantidade de TNFR-Fc produzido sob outras condições idênticas em outro meio idêntico que não possui a referida característica do meio.

27. Método da reivindicação 1, em que a referida quantidade total do referido TNFR-Fc produzido é, pelo menos, 2 vezes superior à quantidade de TNFR-Fc produzida sob outras condições idênticas em outro meio idêntico que não possui a referida característica do meio.

28. Método da reivindicação 1, em que a referida cultura celular é ainda proporcionada com componentes suplementares.

29. Método da reivindicação 28, em que os referidos componentes suplementares são proporcionados a múltiplos intervalos.

30. Método da reivindicação 28 em que os referidos componentes suplementares são seleccionados a partir de um grupo consistindo em hormonas e/ou outros factores de crescimento, iões particulares (tais como sódio, cloro, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões, vitaminas, nucleósidos ou nucleótidos, oligoelementos (compostos inorgânicos normalmente presentes a concentrações muito baixas), aminoácidos, lípidos, ou glucose ou outra fonte de energia.

31. Método da reivindicação 1, em que a referida cultura não é suplementada com componentes adicionais durante a produção do referido TNFR-Fc.

32. Método da reivindicação 1, em que glicil-glutamina é substituída por glutamina na referida cultura.

33. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina, e prolina por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 25 mM.

34. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina, e prolina por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 35 mM.

35. Método da reivindicação 1, em que o referido meio possui uma característica do meio seleccionada do grupo consistindo em:

- (i) uma quantidade cumulativa total de histidina por unidade de volume superior a aproximadamente 1,7 mM;
- (ii) uma quantidade cumulativa total de isoleucina por unidade de volume superior a aproximadamente 3,5 mM;
- (iii) uma quantidade cumulativa total de leucina por unidade de volume superior a aproximadamente 5,5 mM;
- (iv) uma quantidade cumulativa total de metionina por unidade de volume superior a aproximadamente 2,0 mM;
- (v) uma quantidade cumulativa total de fenilalanina por unidade de volume superior a aproximadamente 2,5 mM;
- (vi) uma quantidade cumulativa total de prolina por unidade de volume superior a aproximadamente 2,5 mM;
- (vii) uma quantidade cumulativa total de triptofano por unidade de volume superior a aproximadamente 1,0 mM; e
- (viii) uma quantidade cumulativa total de tirosina por unidade de volume superior a aproximadamente 2,0 mM.

36. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de serina por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 10 mM.

37. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total asparagina cumulativa por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 8 mM.

38. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total asparagina cumulativa por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 12 mM.

39. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de fósforo por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 5 mM.

40. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de glutamato por unidade de volume no referido meio é inferior a aproximadamente 1 mM.

41. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa pantotenato de cálcio por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 20 mg/L.

42. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de nicotinamida por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 25 mg/L.

43. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de piridoxina e piridoxal por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 35 mg/L.

44. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa riboflavina por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 2,0 mg/L.

45. Método da reivindicação 1, em que a quantidade total cumulativa de cloridrato de tiamina por unidade de volume no referido meio é superior a aproximadamente 35 mg/L.

46. Método da reivindicação 1, em que o referido meio compreende um meio contendo glutamina e possuindo uma característica do meio seleccionada do grupo consistindo em:

(i) uma concentração de aminoácidos inicial superior a cerca de 70 mM, (ii) uma proporção molar de glutamina inicial para asparagina inicial inferior a cerca de 2, (iii) uma proporção molar de glutamina inicial para aminoácidos totais iniciais inferior a cerca de 0,2, (iv) uma proporção molar de ião inorgânico inicial para aminoácidos totais iniciais entre cerca de 0,4 a 1, (v) uma concentração combinada de glutamina inicial e asparagina inicial superior a cerca de 16 mM, e suas combinações.

47. Método de produção de TNFR-Fc cultura celular de produção em larga escala compreendendo os passos de;

proporcionar uma cultura celular compreendendo:

células de mamíferos que contêm um gene que codifica TNFR-Fc, gene que é expresso sob condição de cultura celular;

e

um meio definido contendo glutamina e possuindo, pelo menos, duas características do meio selecionadas do grupo consistindo em: i) uma concentração de aminoácidos inicial superior a cerca de 70 mM, ii) uma proporção molar de glutamina para asparagina inferior a cerca de 2, iii) uma proporção molar de glutamina para aminoácidos totais inferior a cerca de 0,2, iv) uma proporção molar de ião inorgânico para aminoácidos totais entre cerca de 0,4 to 1, e v) uma concentração combinada de glutamina para asparagina superior a cerca de 16 mM;

manutenção da referida cultura numa fase inicial de crescimento sob um primeiro conjunto de condições de cultura durante um primeiro período de tempo suficiente para permitir que as referidas células se reproduzam num intervalo de cerca de 20%-80% densidade celular viável máxima possível se a referida cultura

foi mantida sob o primeiro conjunto de condições de cultura;

alteração de, pelo menos, uma das condições de cultura, de modo que um segundo conjunto de condições de cultura é aplicado; manutenção da referida cultura durante um segundo período de tempo sob o segundo conjunto de condições e durante um segundo período de tempo de modo que o TNFR-Fc se acumula na cultura celular.

48. Método da reivindicação 47, em que o referido meio possui as características do meio de:

- i) uma concentração de aminoácidos inicial superior a cerca de 70 mM,
- ii) uma proporção de glutamina para asparagina inferior a cerca de 2,
- iii) uma proporção molar de glutamina para aminoácidos totais inferior a cerca de 0,2,
- iv) uma proporção molar de ião inorgânico para aminoácidos totais entre cerca de 0,4 a 1, e
- v) uma concentração combinada de glutamina e asparagina superior a cerca de 16 mM.

49. Método de qualquer uma das reivindicações 1-2 ou 46- 48, em que:

os níveis de lactato são inferiores aos níveis

observados sob outras condições idênticas em outro meio idêntico que não possui a referida característica do meio;

os níveis de amónio são inferiores aos níveis observados sob outras condições idênticas em outro meio idêntico que não possui a referida característica do meio; e

a quantidade total de TNFR-Fc produzido é, pelo menos, tão elevada como a observada sob outras condições idênticas em outro meio idêntico que não possui a referida característica do meio.

50. Método da reivindicação 1 ou 47, em que o TNFR-Fc produzido é isolado e/ou purificado para utilização como ou na preparação de produtos farmacêuticos.

Lisboa, 15 de Abril de 2010

Figura 1. Comparação do Meio 1 e Meio 2 em frascos de agitação utilizando células anti-GDF-8.

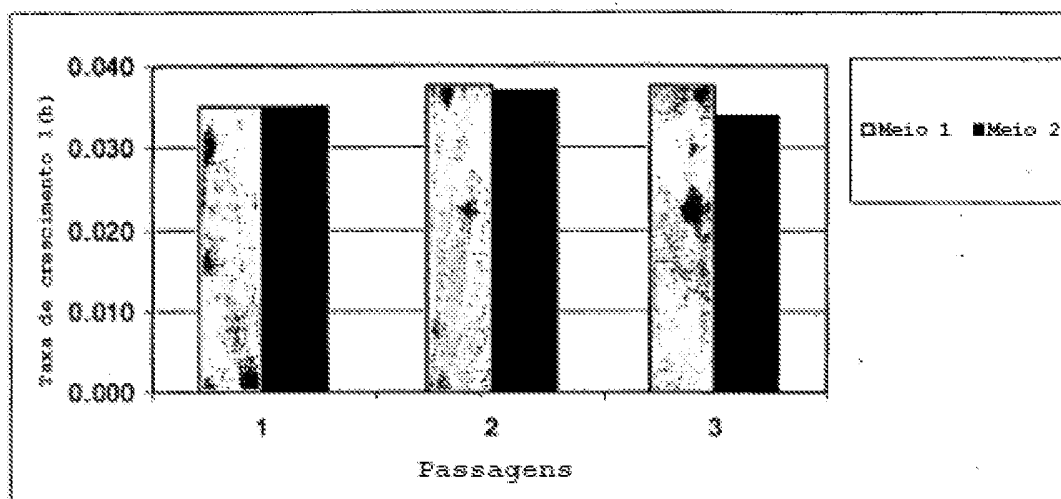


Figura 2. Crescimento celular e viabilidade de células anti-GDF-8 no Meio 1.

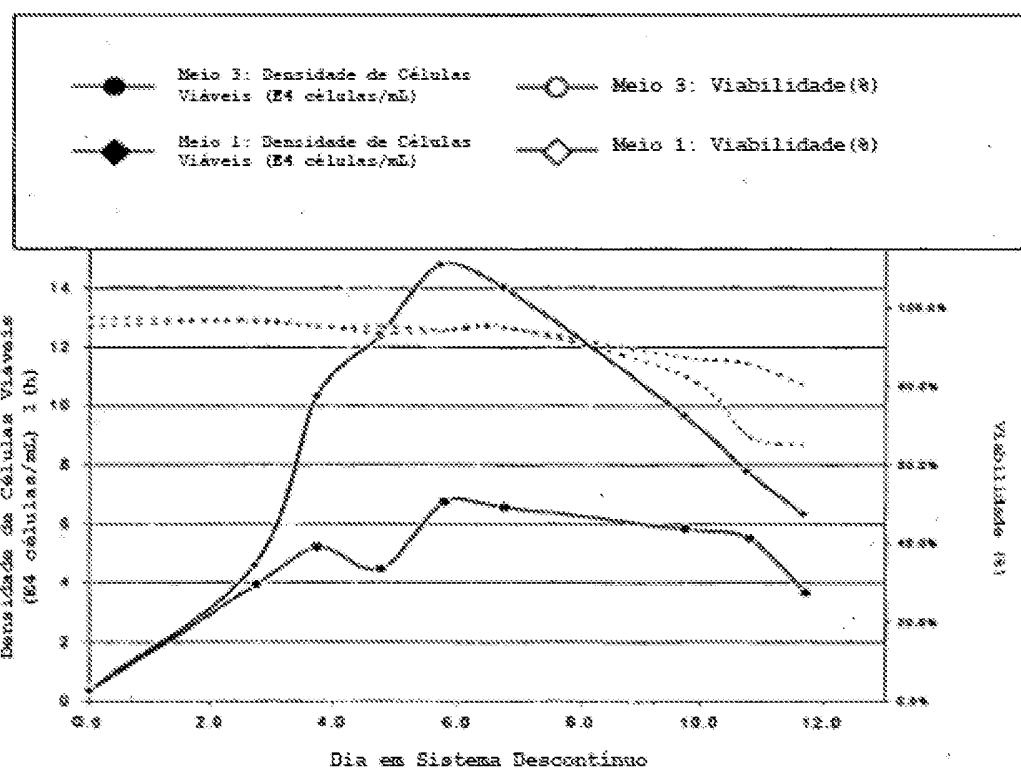


Figura 3. Crescimento celular de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e sem adição de glutamina.

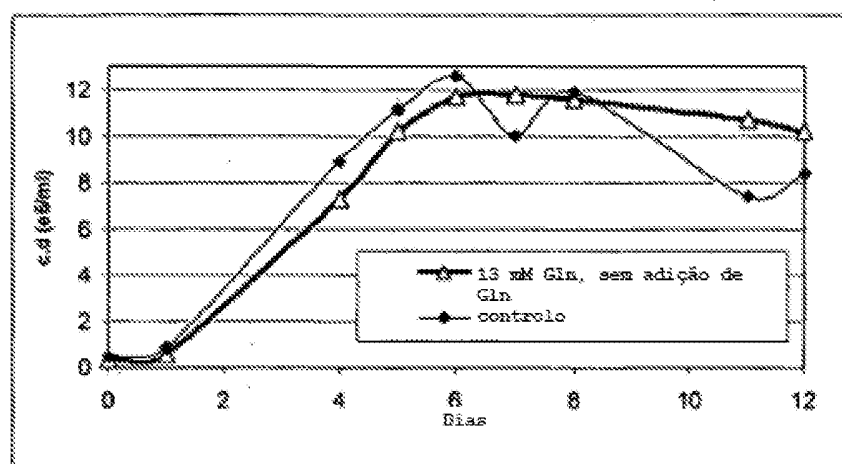


Figura 4. Viabilidade celular de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e sem adição de glutamina.

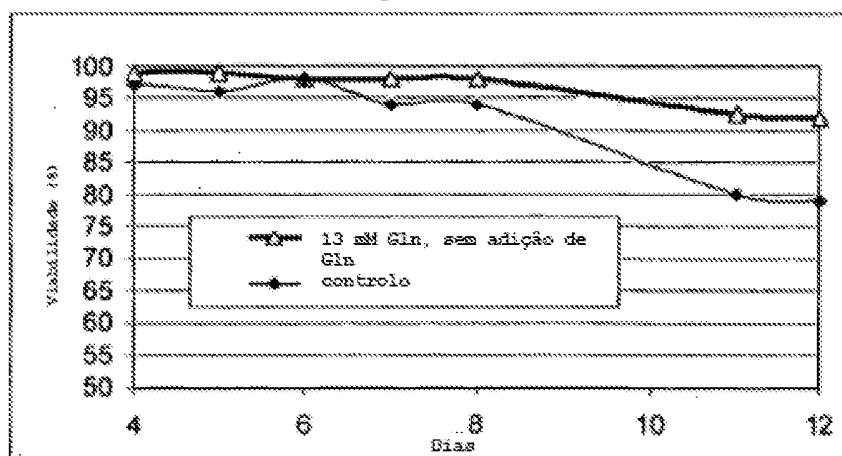


Figura 5. Níveis de amônio culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e sem adição de glutamina.

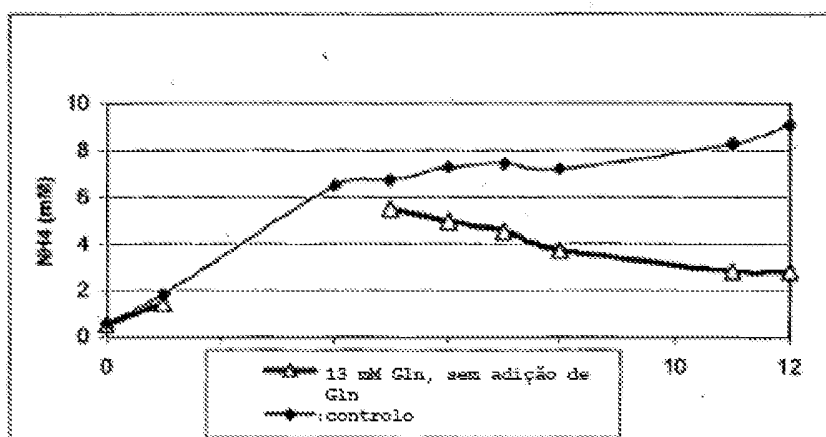


Figura 6. Níveis de lactato de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e sem adição de glutamina.

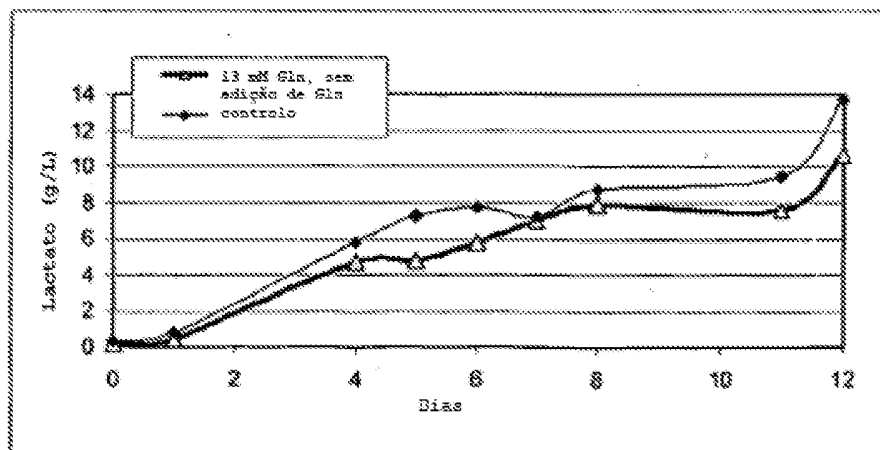


Figura 7. Título de anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e sem adição de glutamina.

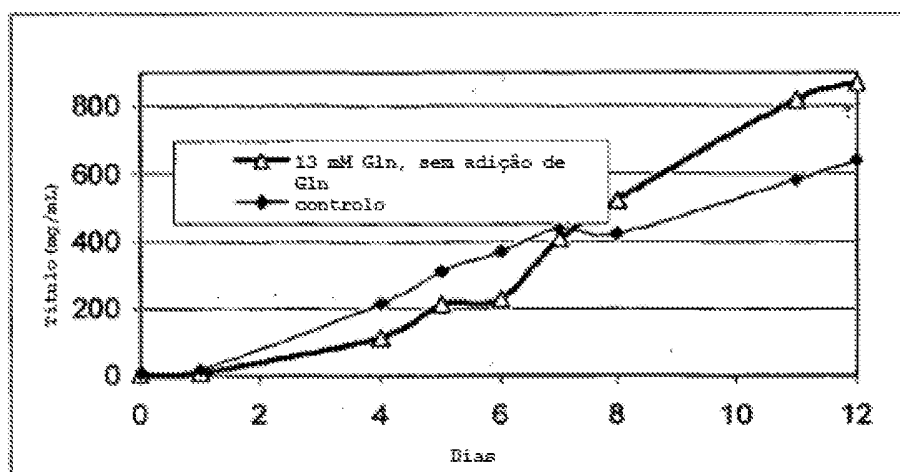


Figura 8. Densidade celular de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e de jejum de glutamina.

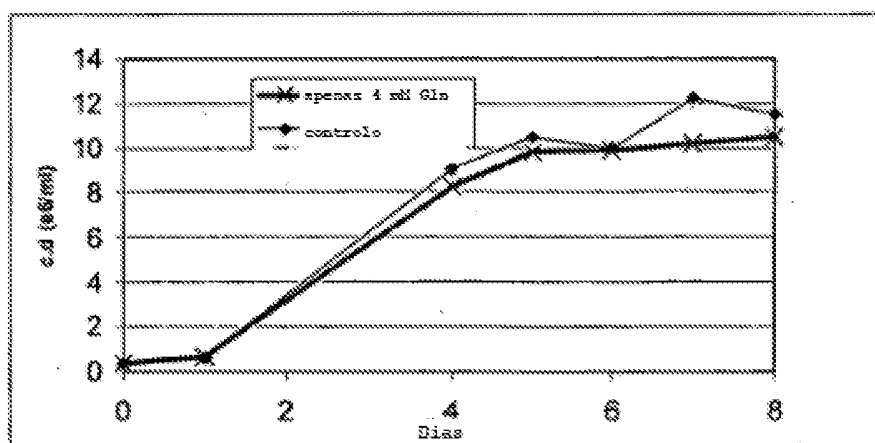


Figura 9. Viabilidade de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controlo e com jejum de glutamina.

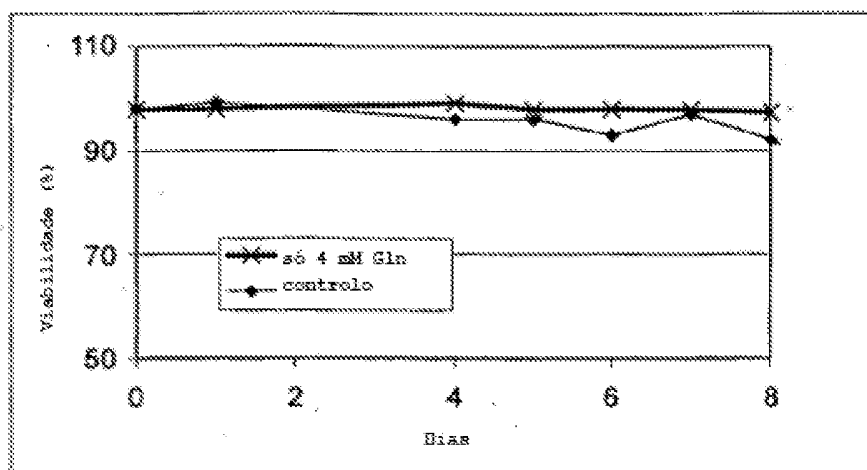


Figura 10. Níveis de amónio de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controlo e de jejum de glutamina.

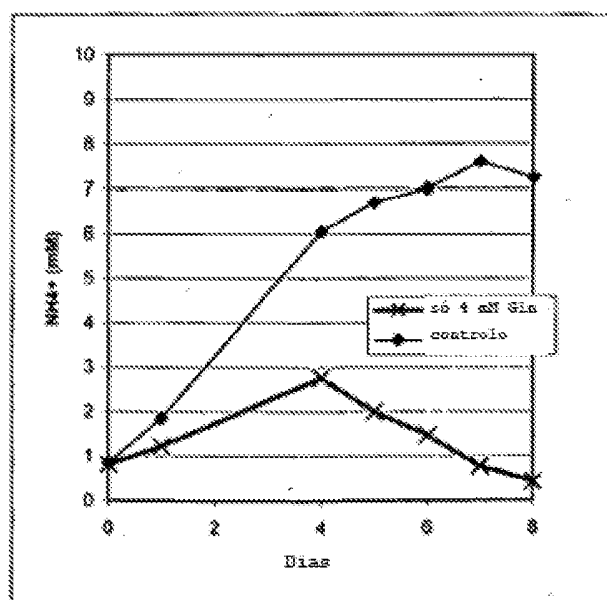


Figura 11. Níveis de lactato de culturas de células anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e com jejum de glutamina.

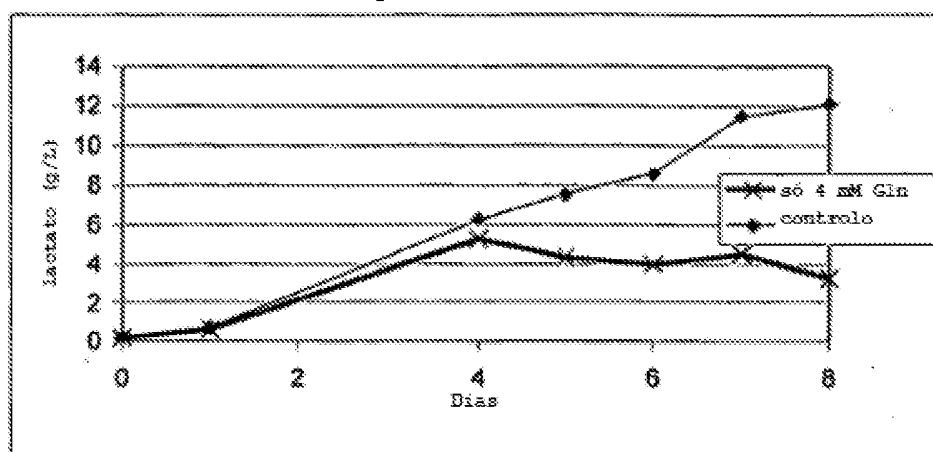


Figura 12. Título de anti-GDF-8 nas condições de cultura de controle e de jejum de glutamina.

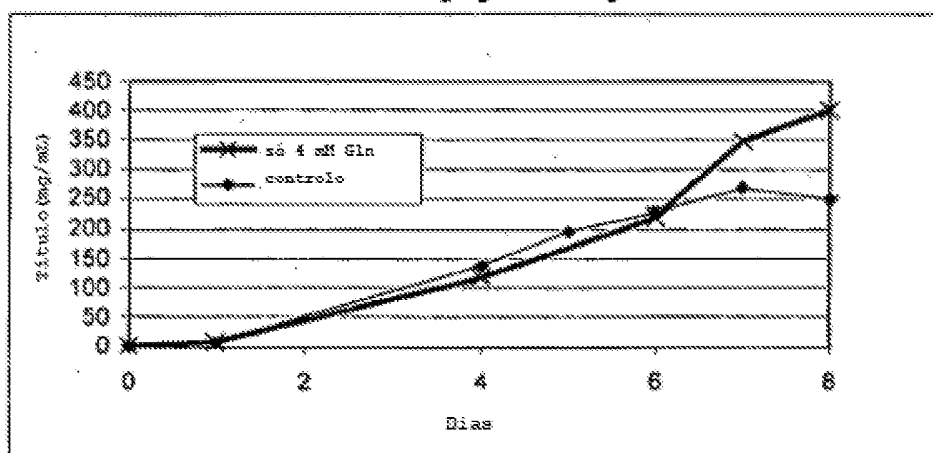


Figura 13. Resposta à dose de ferro de culturas de células anti-GDF-8 no Meio 1 e no Meio 2.

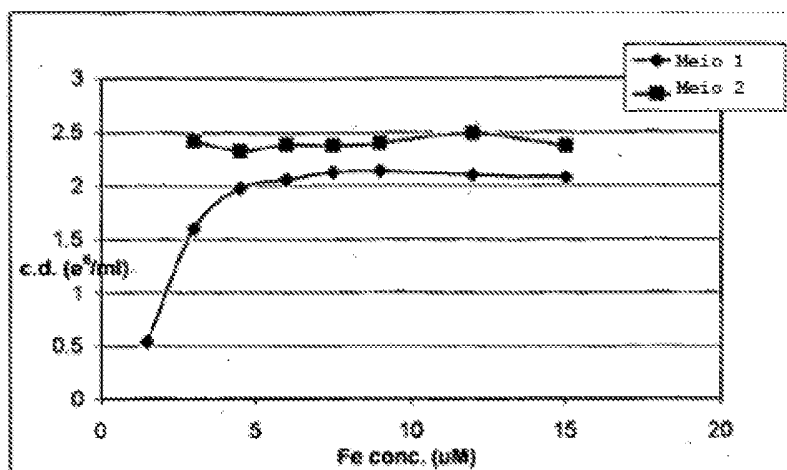


Figura 14. Densidade Celular de culturas anti-GDF-8 alimentadas.

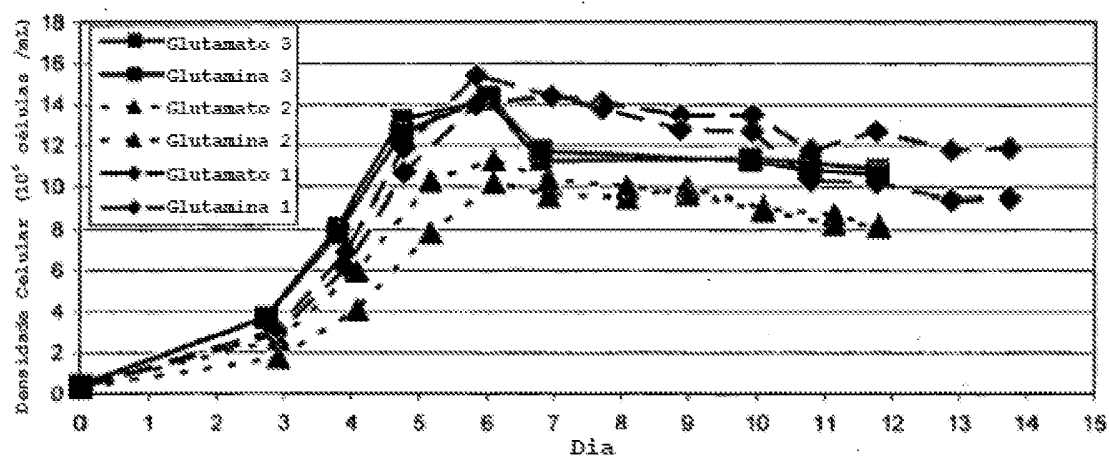


Figura 15. Viabilidade de células de culturas de células alimentadas com Glutamato e Glutamina.

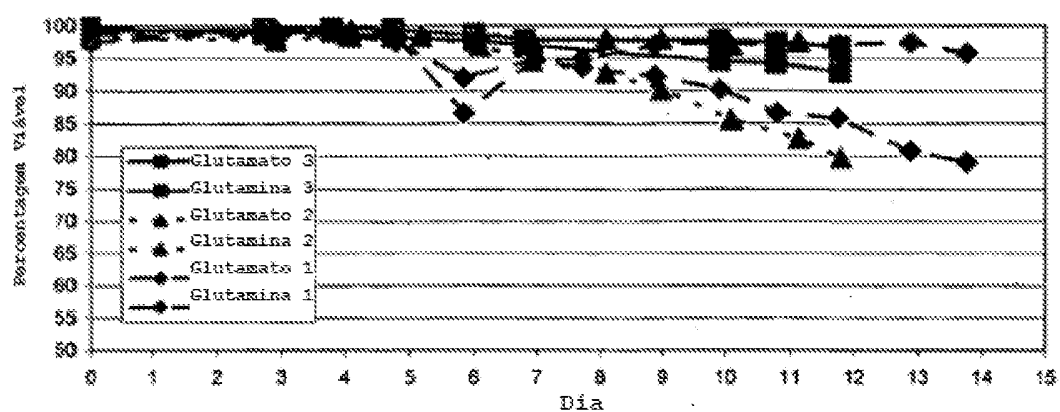


Figura 16. Título de Y anti-Lewis em culturas de células alimentadas com Glutamato e Glutamina.

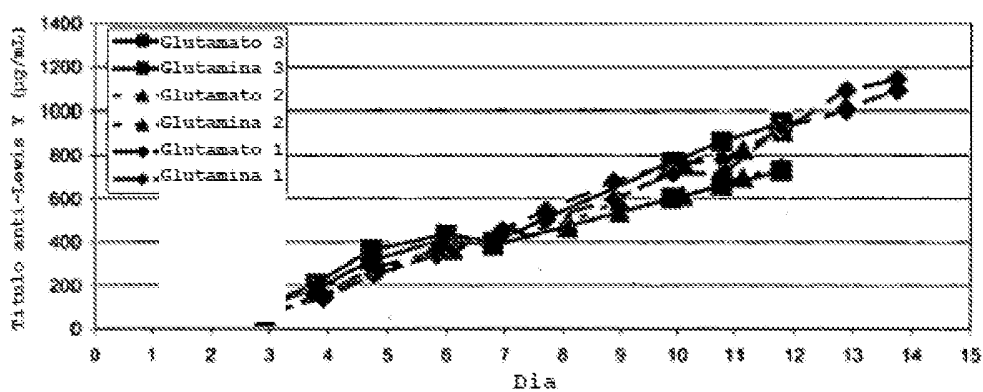


Figura 17. Níveis de lactato de células alimentadas com Glutamato e Glutamina.

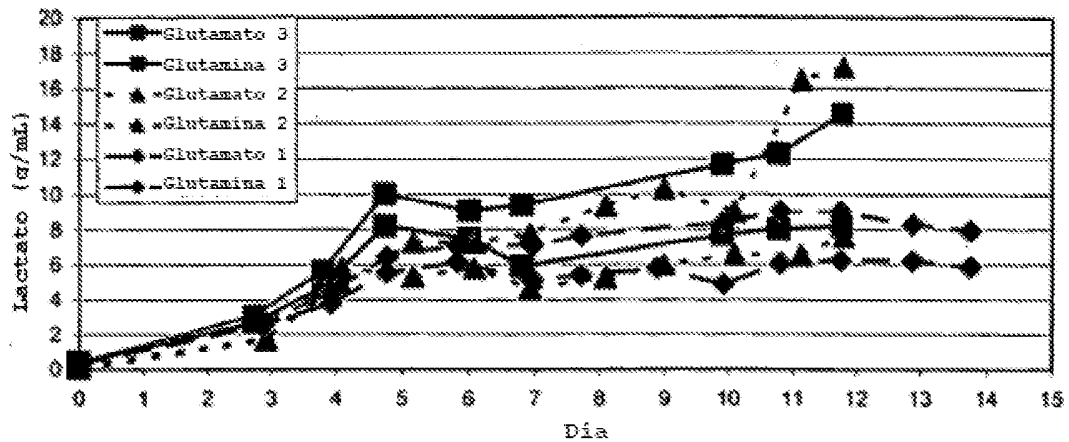


Figura 18. Níveis de amônio de culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

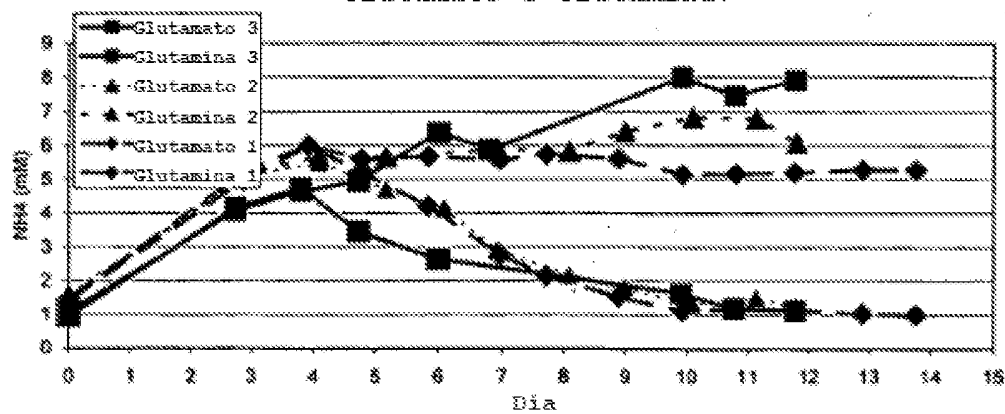


Figura 19. Osmolaridade de culturas alimentadas com Glutamato e Glutamina.

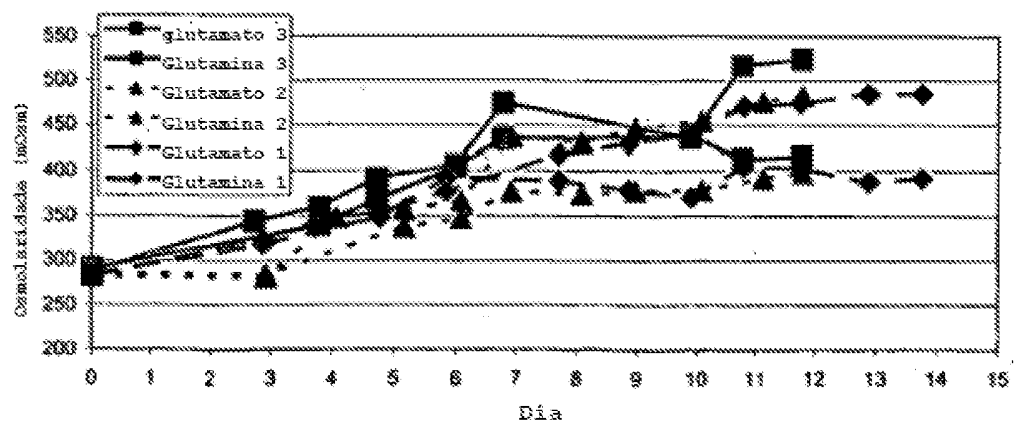


Figura 23. Níveis amônio. Cada gráfico é a média de dois frascos cultivados utilizando as mesmas condições.

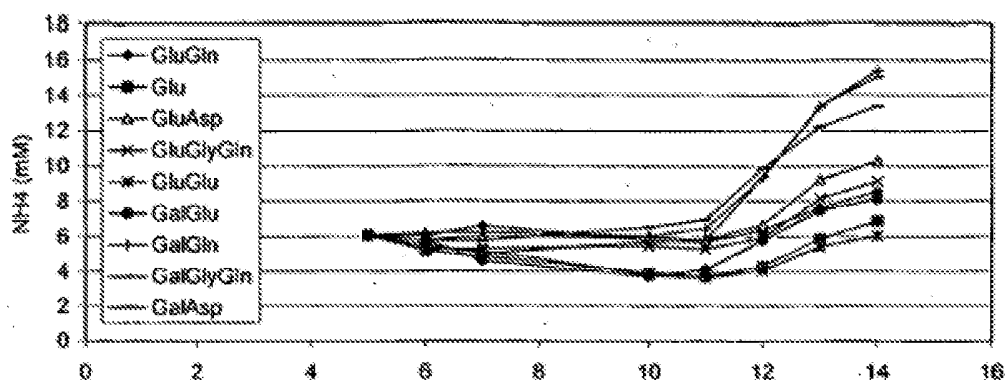


Figura 24. Propulsor

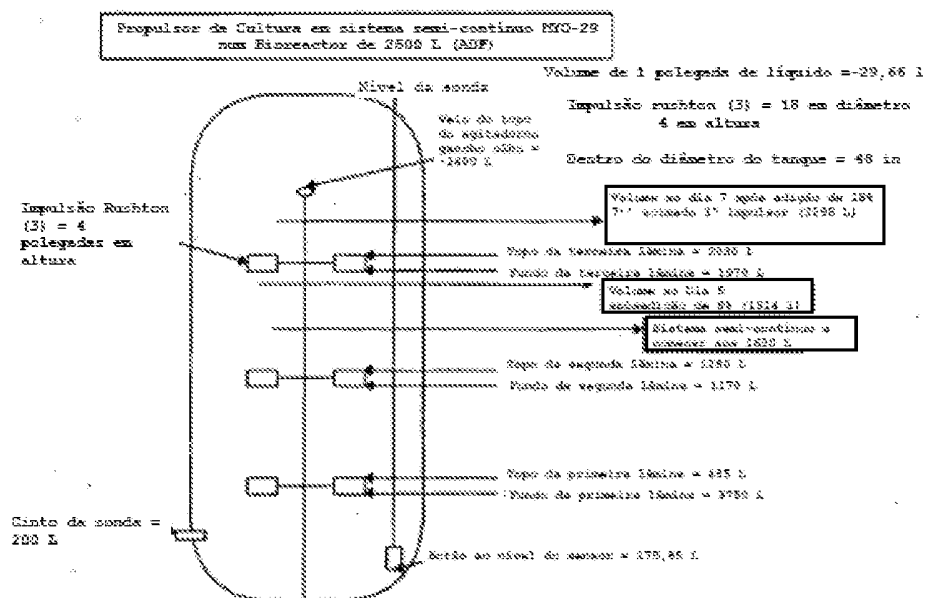


Figura 25. Crescimento celular de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

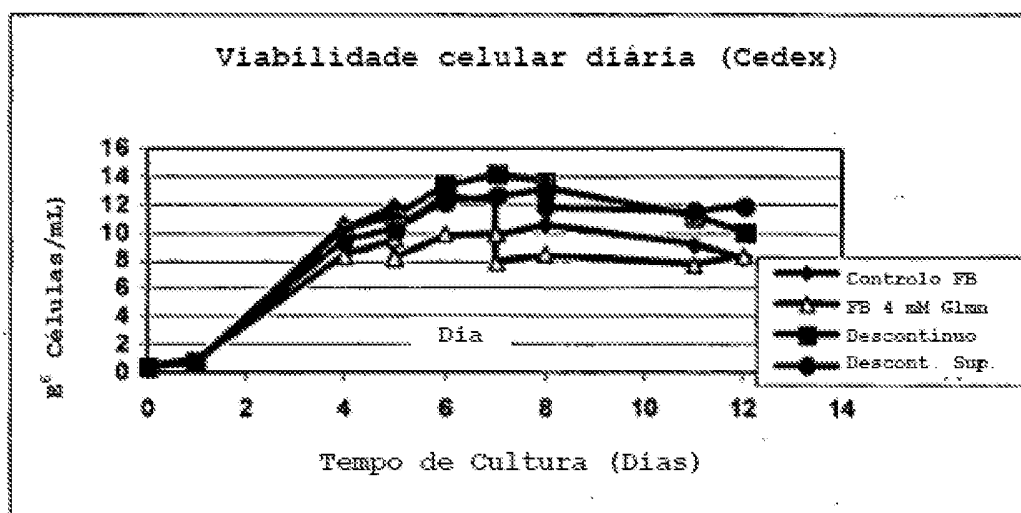


Figura 26. Viabilidade de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

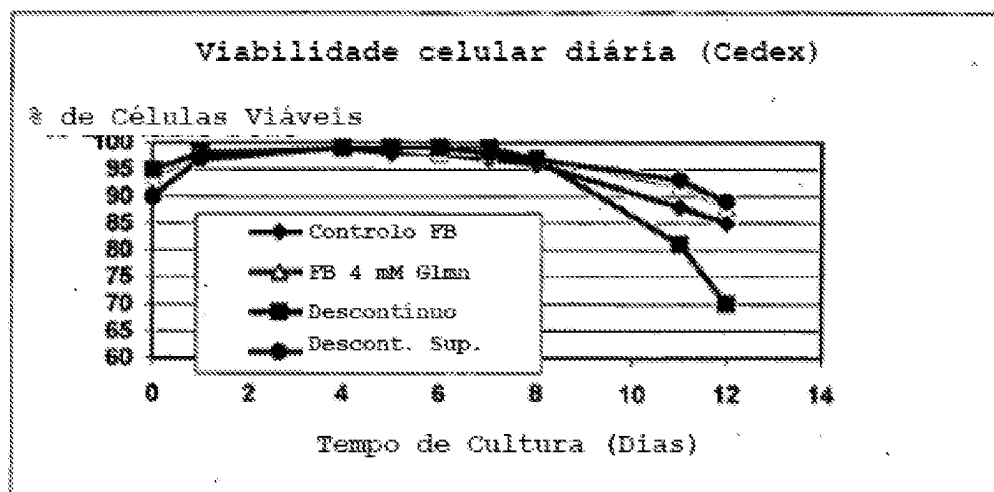


Figura 27. Título de anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

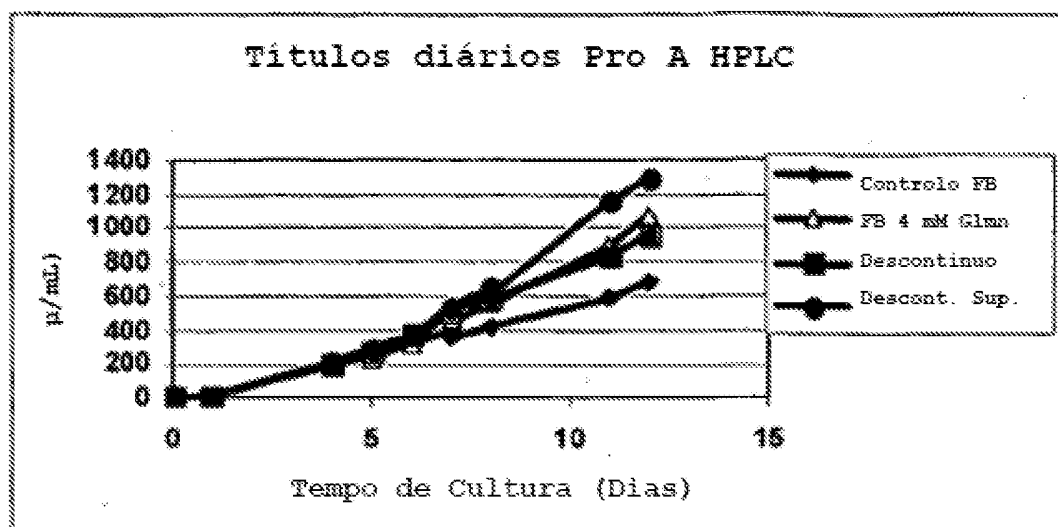


Figura 28. Níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

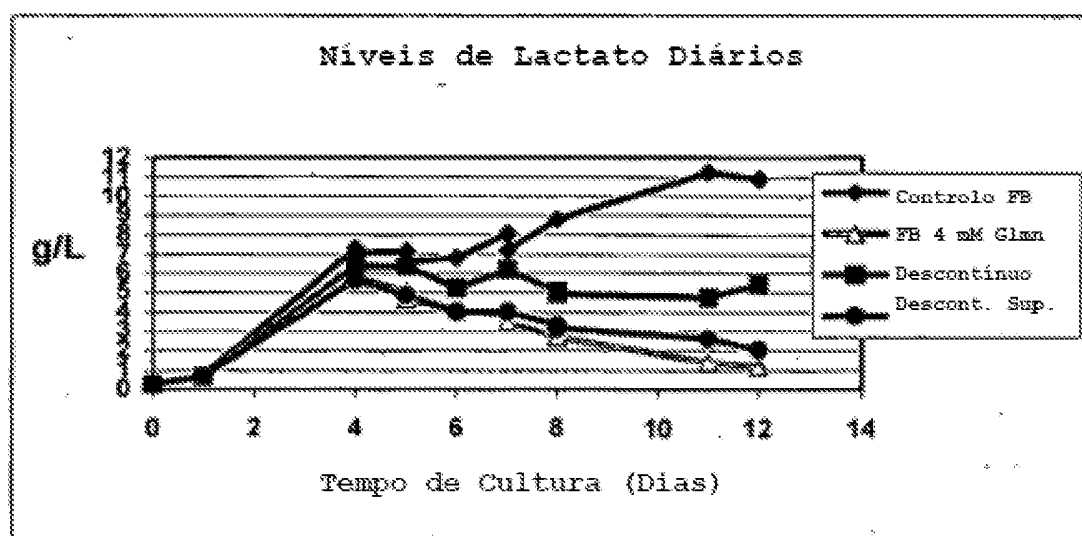


Figura 29. Níveis de amônio de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

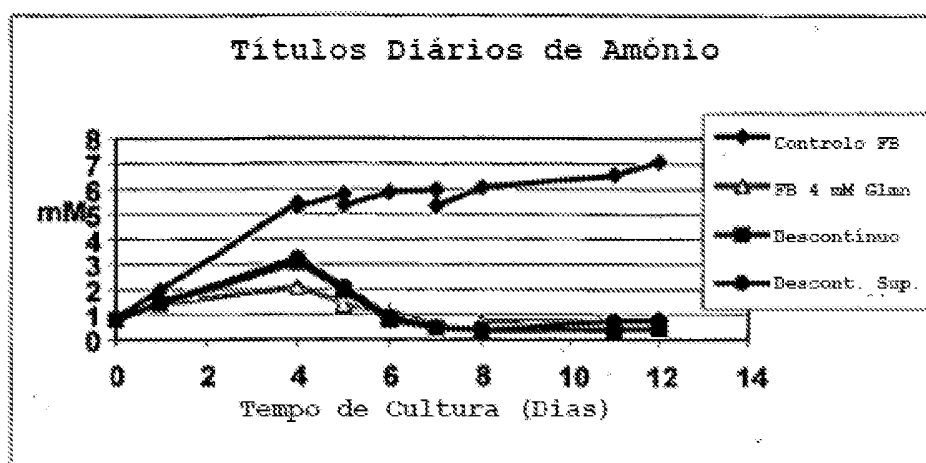


Figura 30. Crescimento celular de células anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

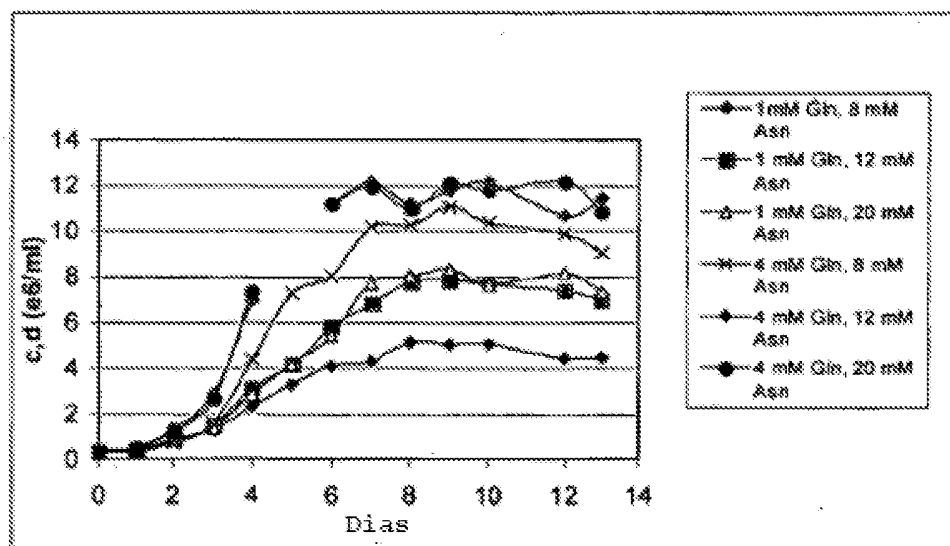


Figura 31. Título de anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

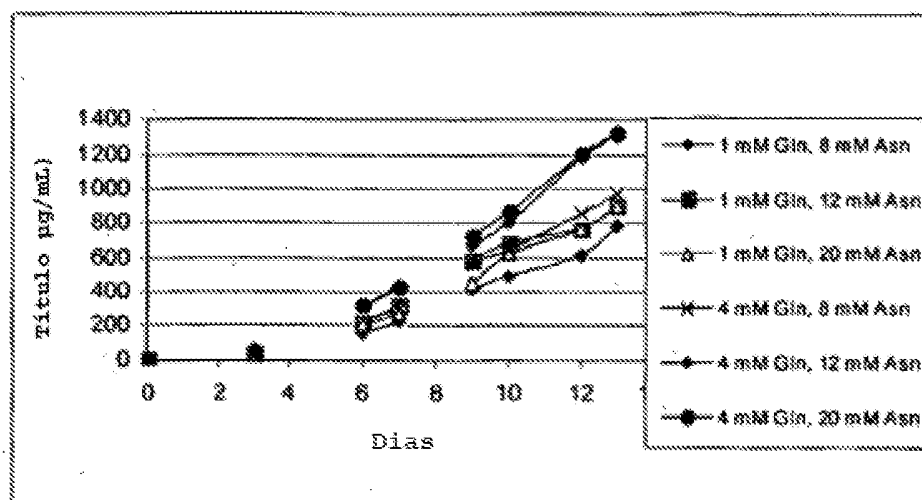


Figura 32. Níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 sob várias condições experimentais

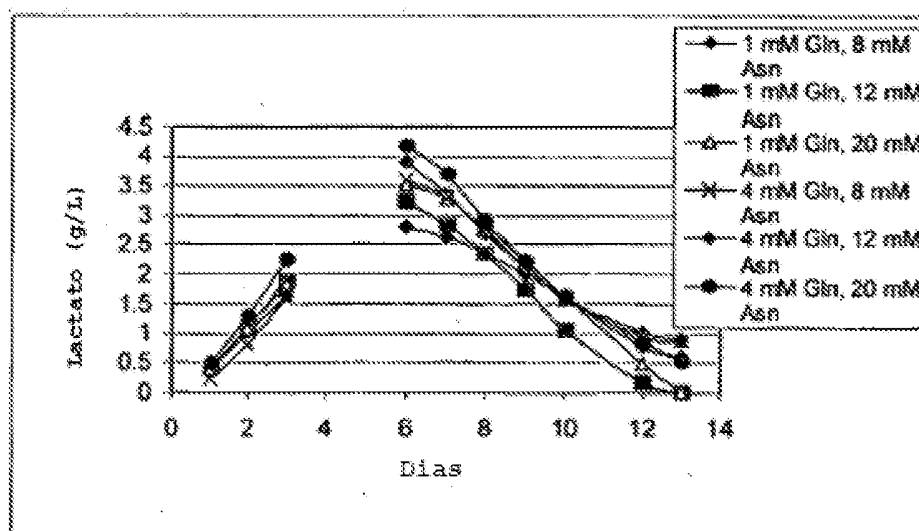


Figura 35. Viabilidade celular de células anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina

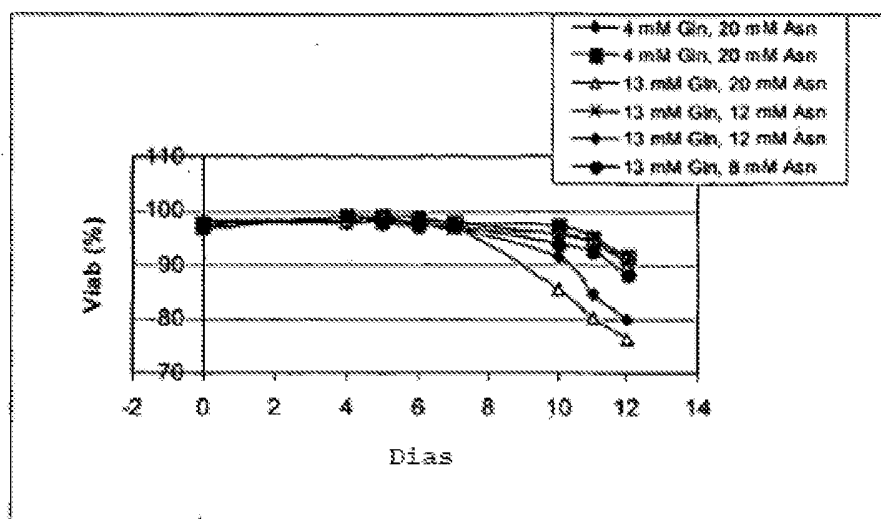


Figura 36. Níveis de lactato de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

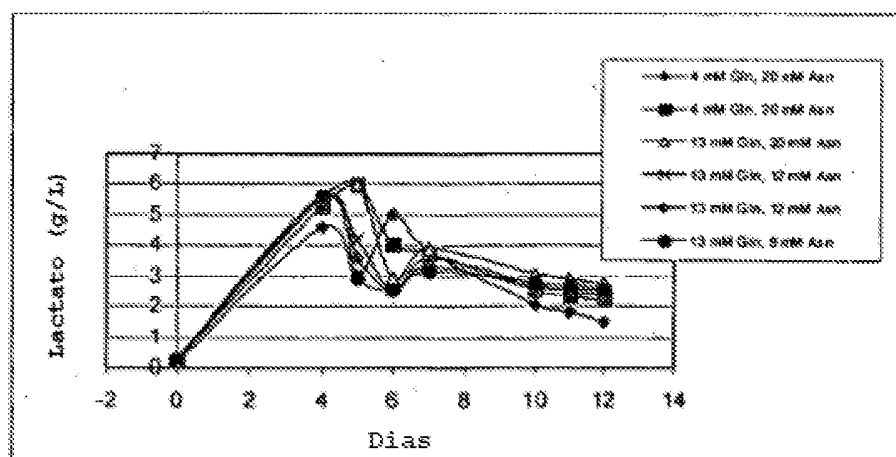


Figura 37. Níveis de Amônio de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

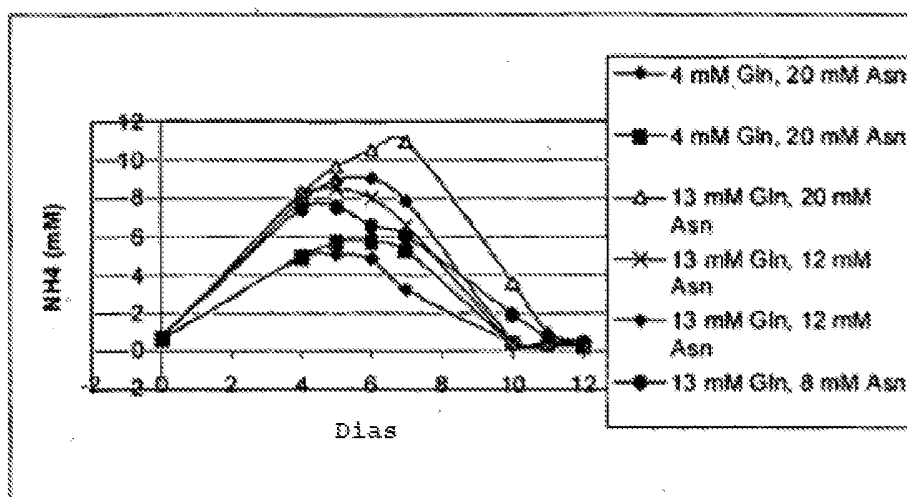


Figura 38. Níveis de glutamina de culturas anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

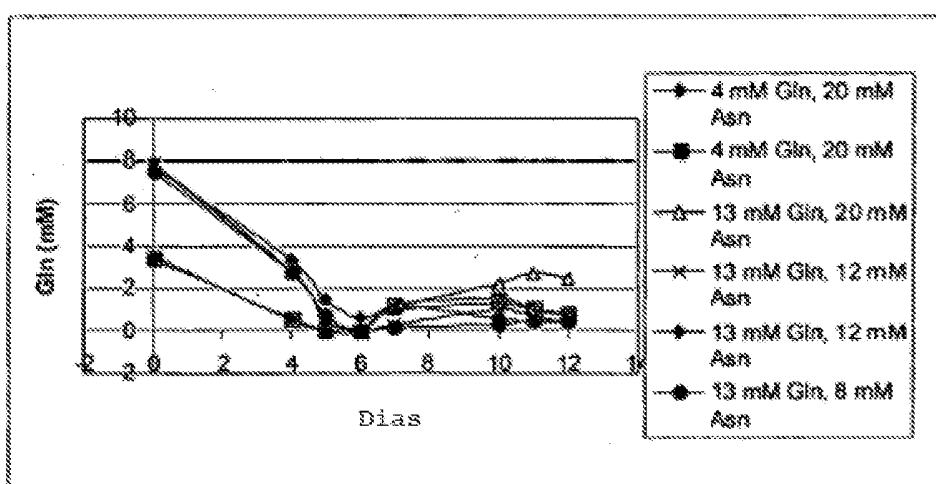


Figura 39. Título de anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

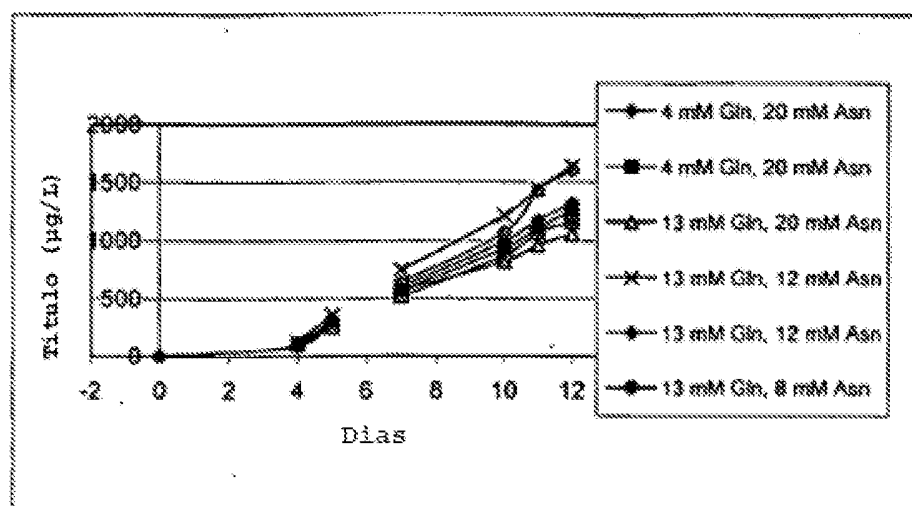


Figura 40. Osmolaridade de anti-GDF-8 em Meio 9 modificado contendo vários níveis de glutamina e asparagina.

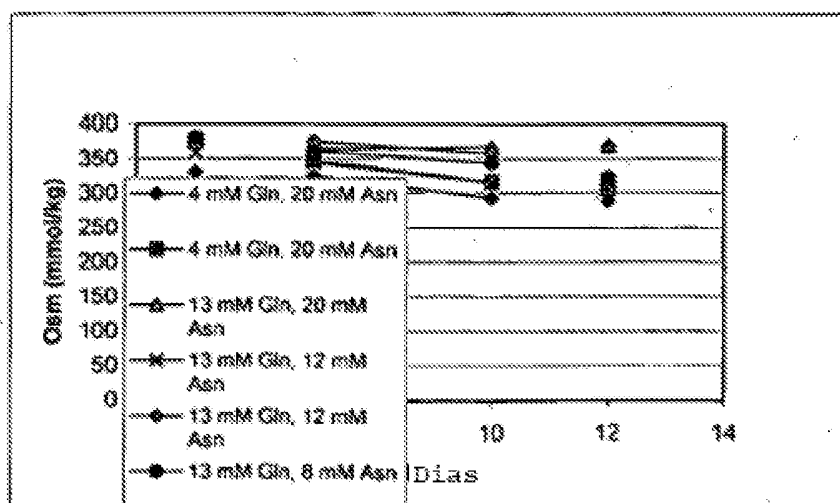


Figura 41. Crescimento celular de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

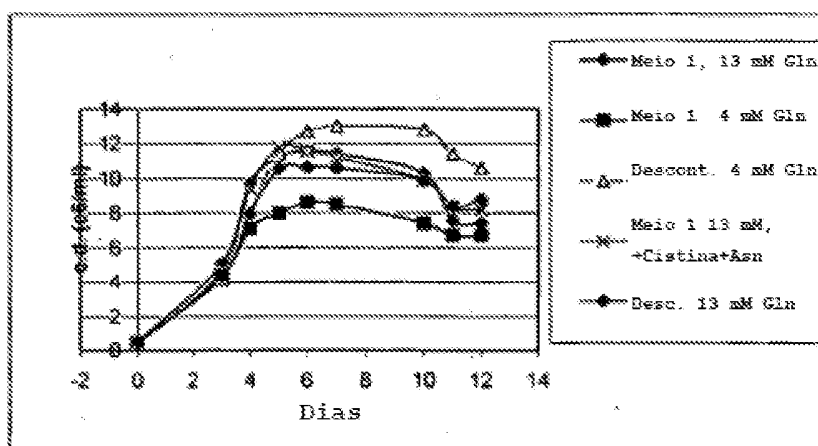


Figura 42. Níveis de lactato em culturas de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

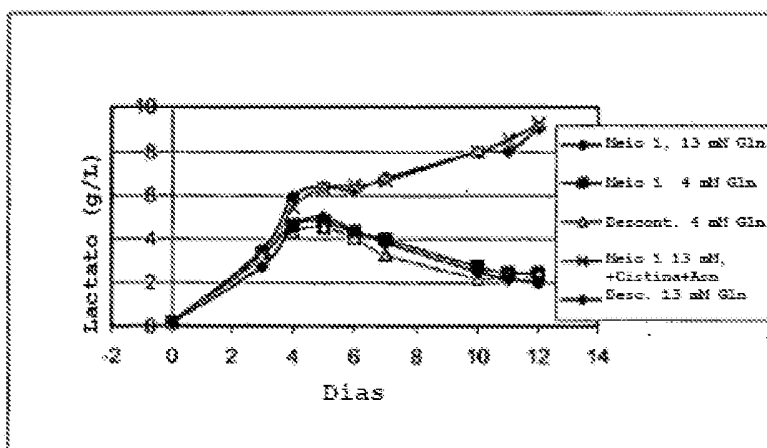


Figura 43. Níveis de amônio de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

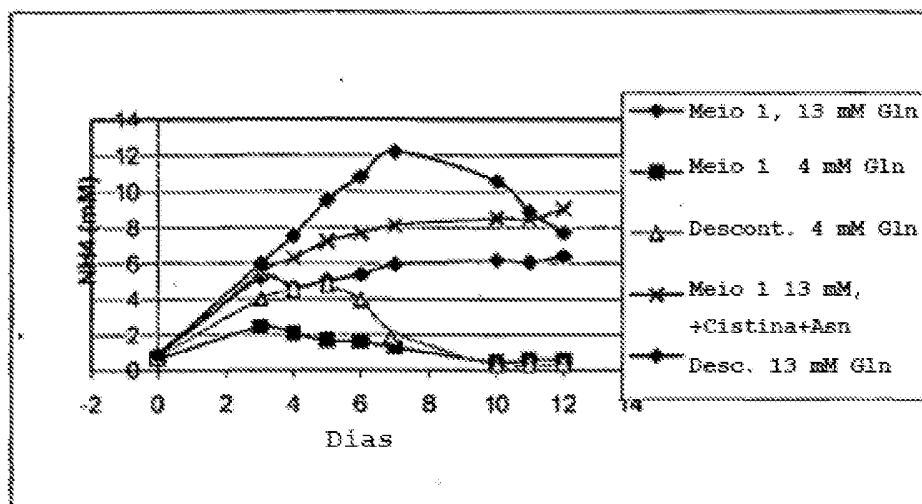


Figura 44. Níveis de glutamina em culturas de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

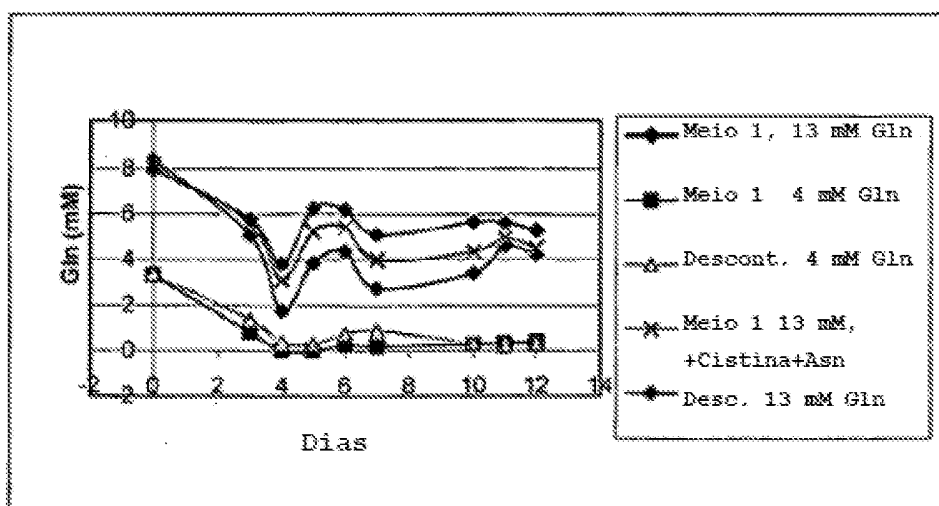


Figura 45. Níveis de glutamato de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

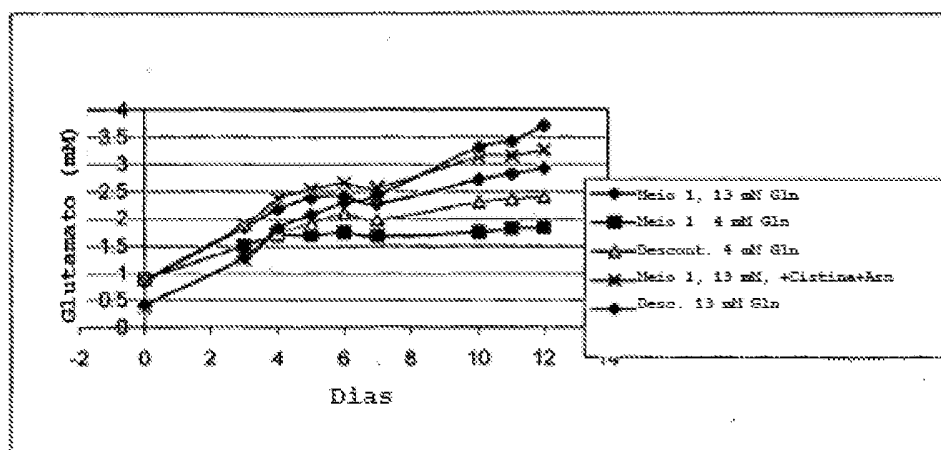


Figura 46. Título de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

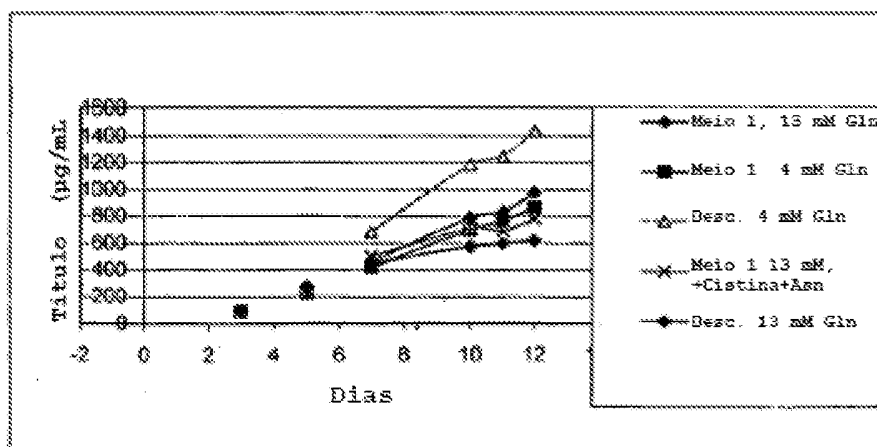


Figura 47. Osmolaridade de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de asparagina e cisteína.

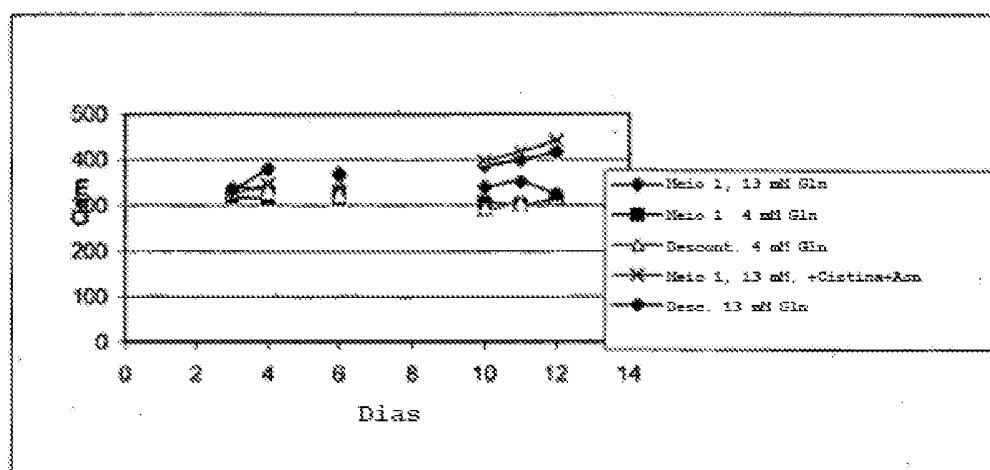


Figura 48. Crescimento celular de células anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

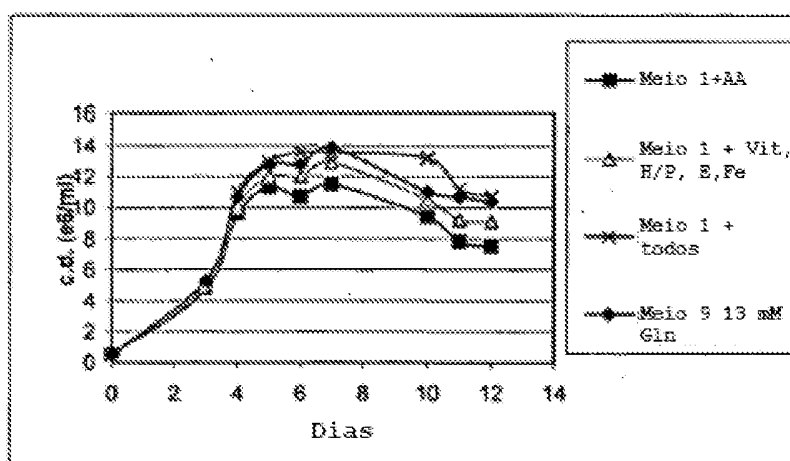


Figura 49. Níveis de lactato de culturas de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

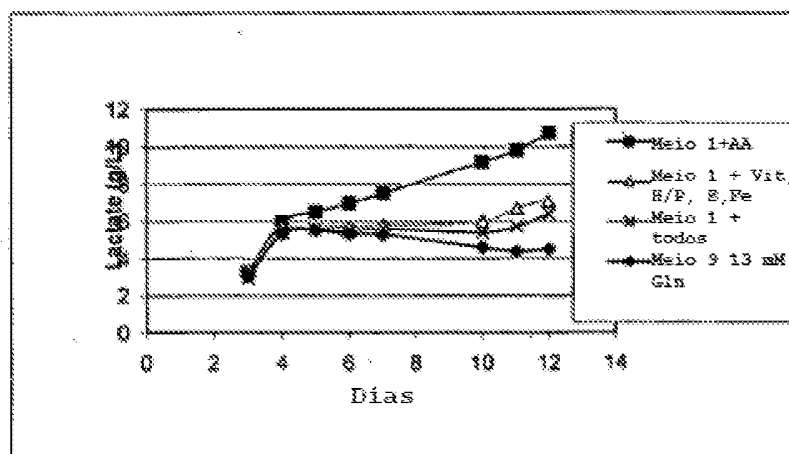


Figura 50. Níveis de amônio de culturas de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

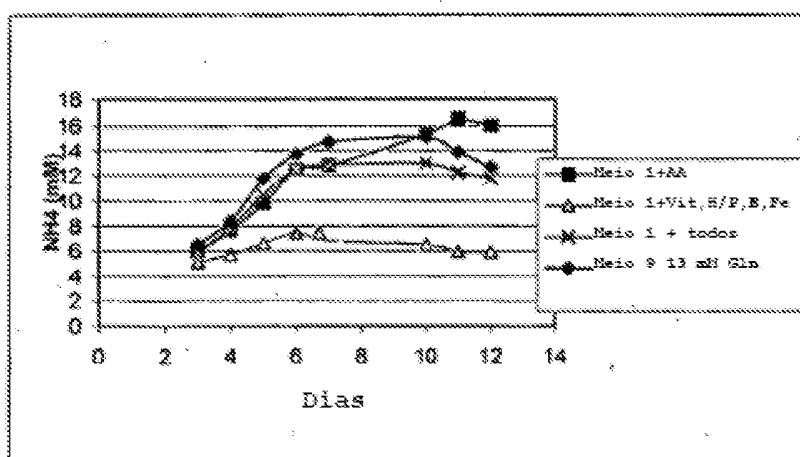


Figura 51. Níveis de glutamina de culturas de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

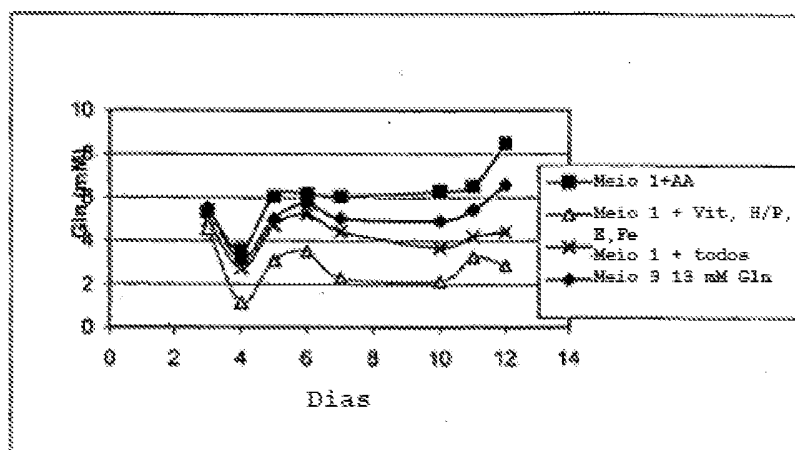


Figura 52. Título de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de aminoácidos e vitaminas.

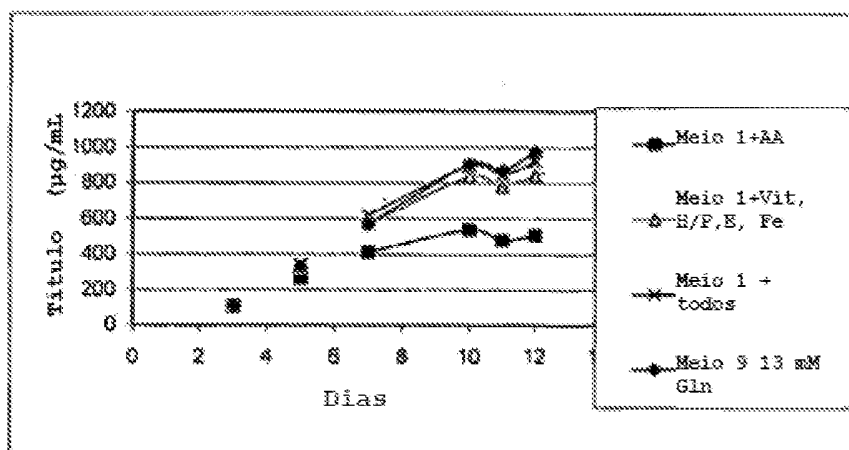


Figura 55. Níveis de amônio de culturas anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

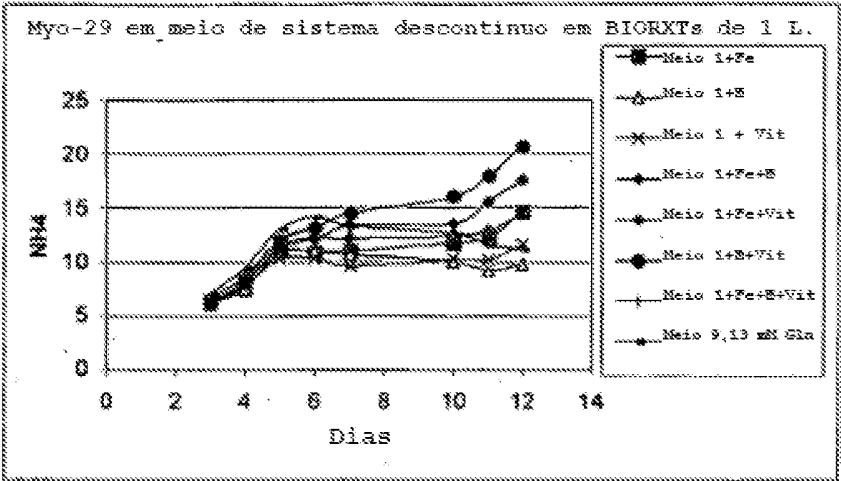


Figura 56. Titulo de anti-GDF-8 em meios contendo vários níveis de vitaminas, oligoelementos E e ferro.

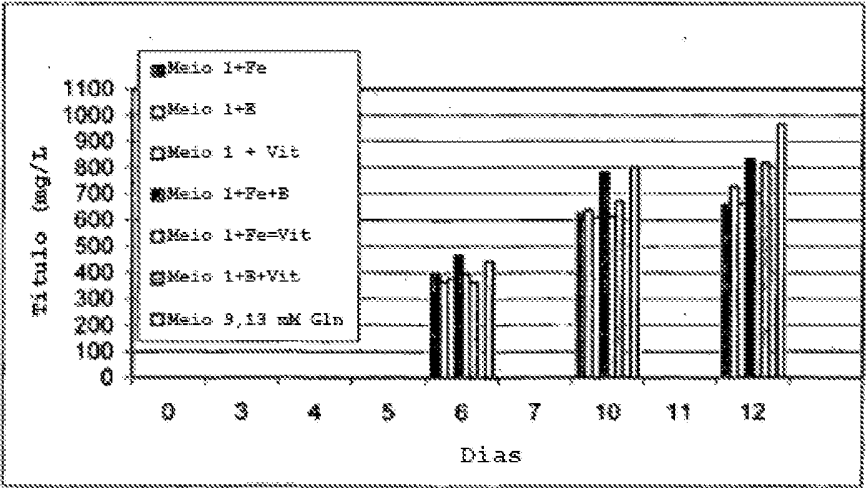


Figura 57. Crescimento celular de células anti-GDF-8 nos Meios 1, 3 e 9.

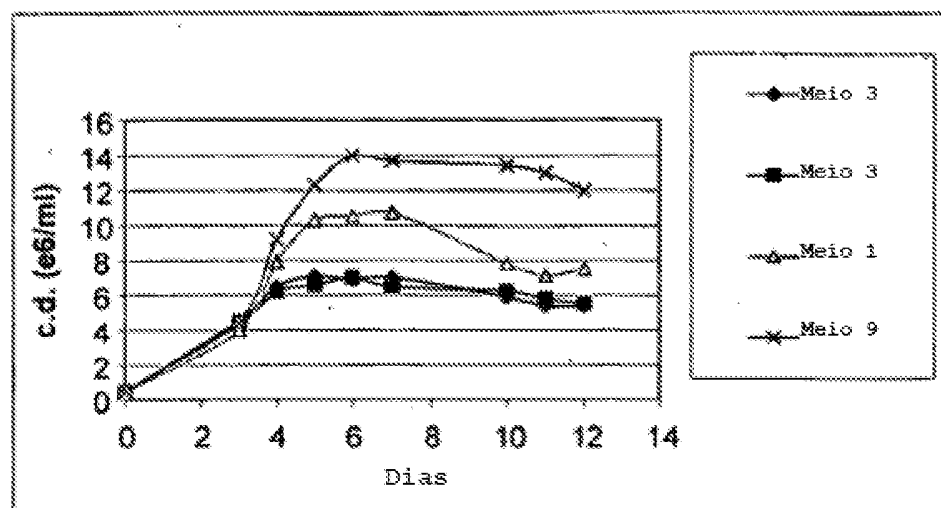


Figura 56. Título de anti-GDF-8 nos Meios 1, 3 e 9.

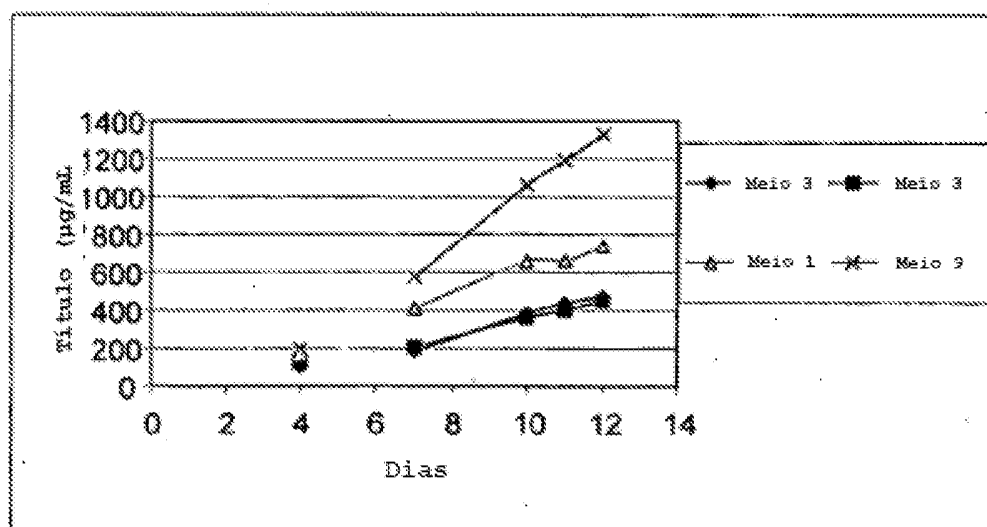


Figura 59. Títulos de anti-GDF-8 extrapolados para vários níveis de apenas glutamina e glutamina e asparagina totais combinadas.

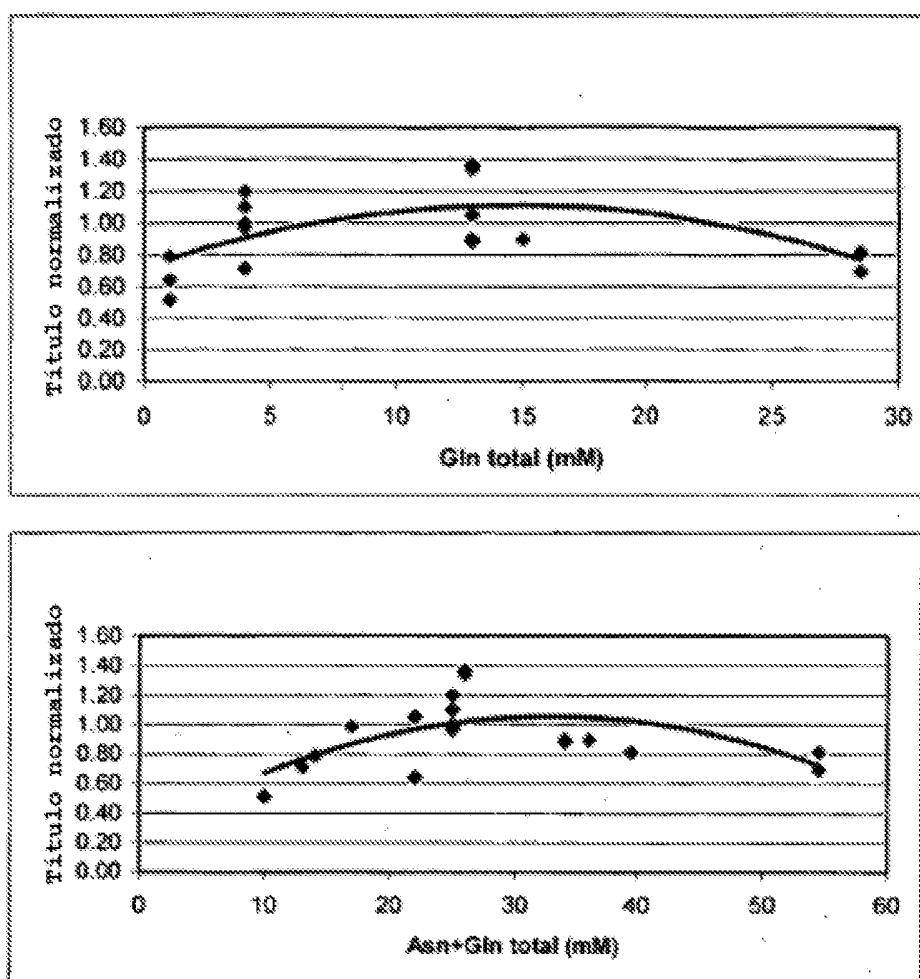


Figura 60. Crescimento de células anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

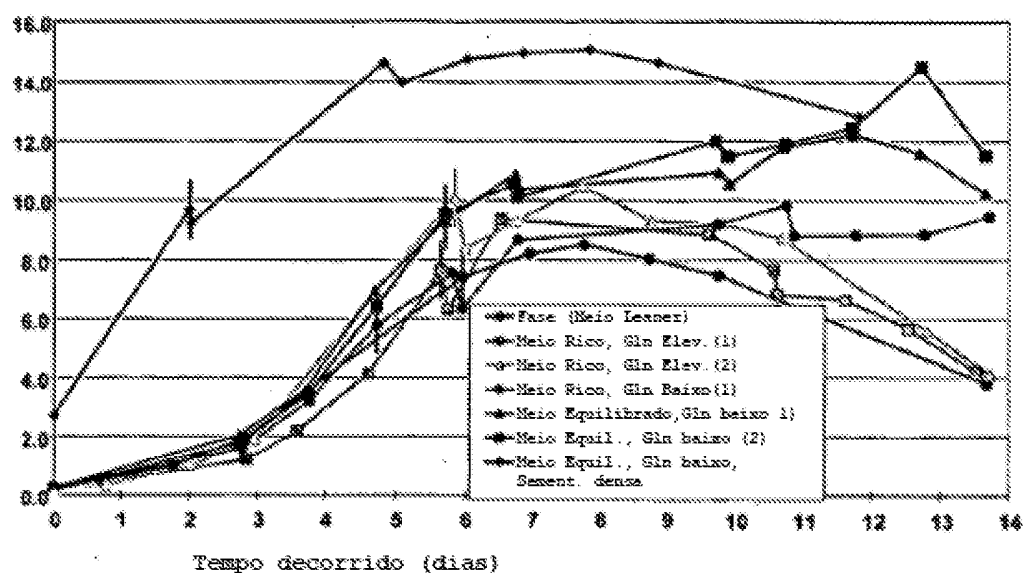


Figura 61. Viabilidade de células anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

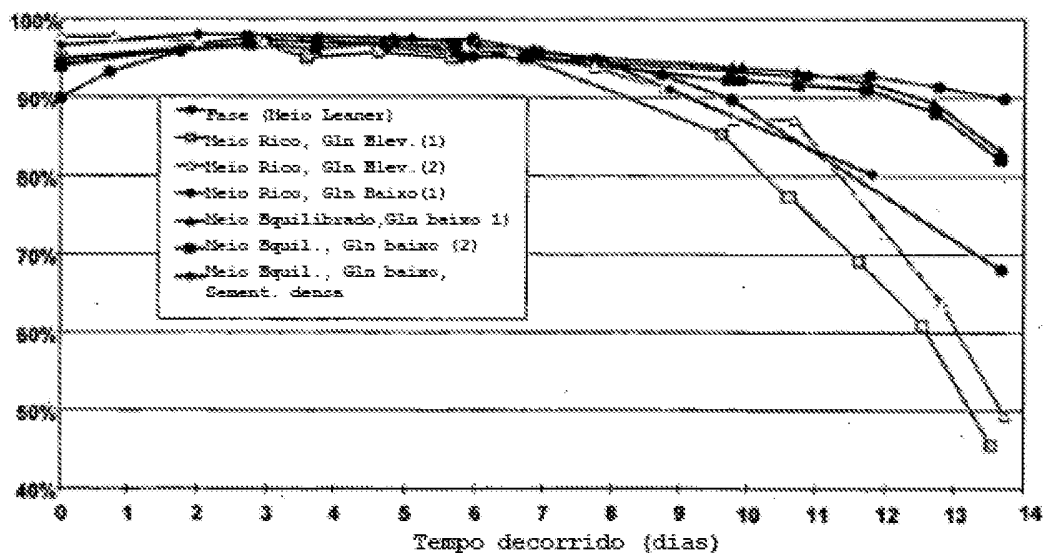


Figura 62. Níveis de lactato de culturas de anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

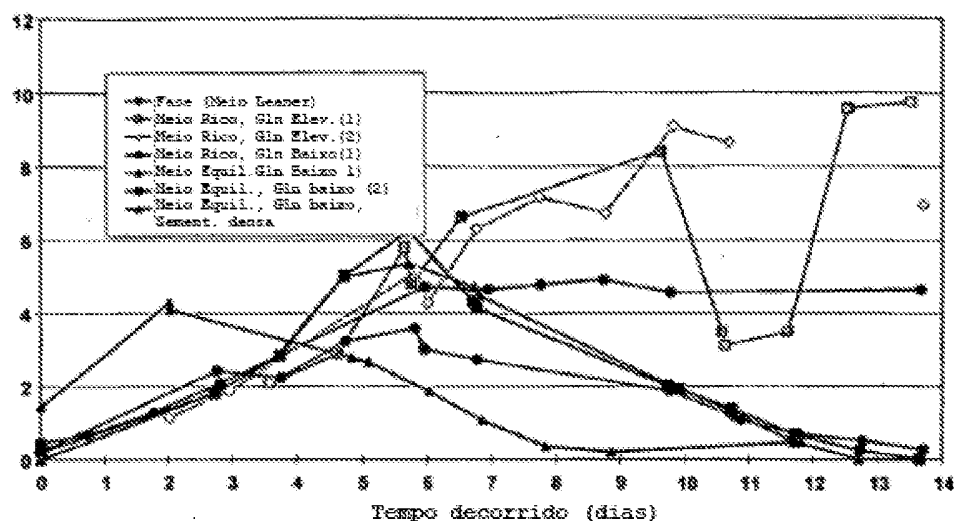


Figura 61. Níveis de amônio de culturas anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

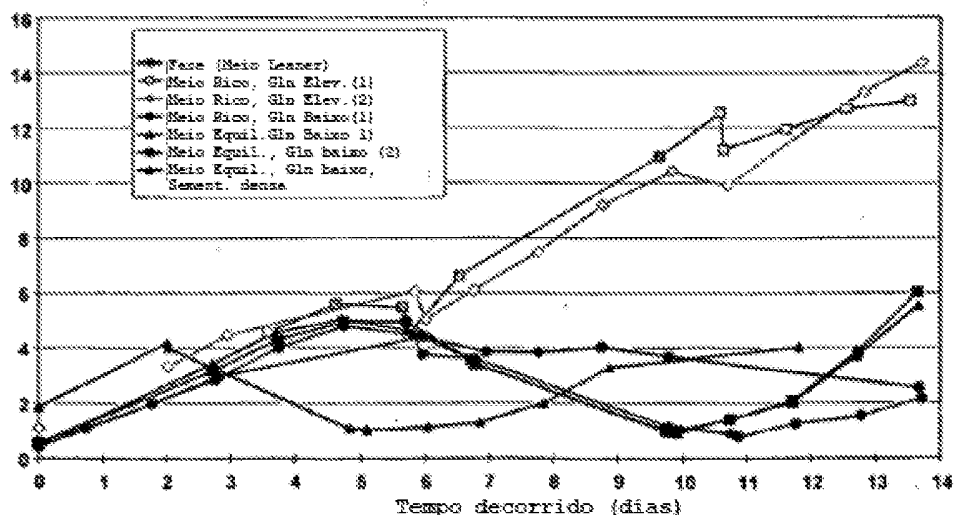


Figura 64. Título de anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

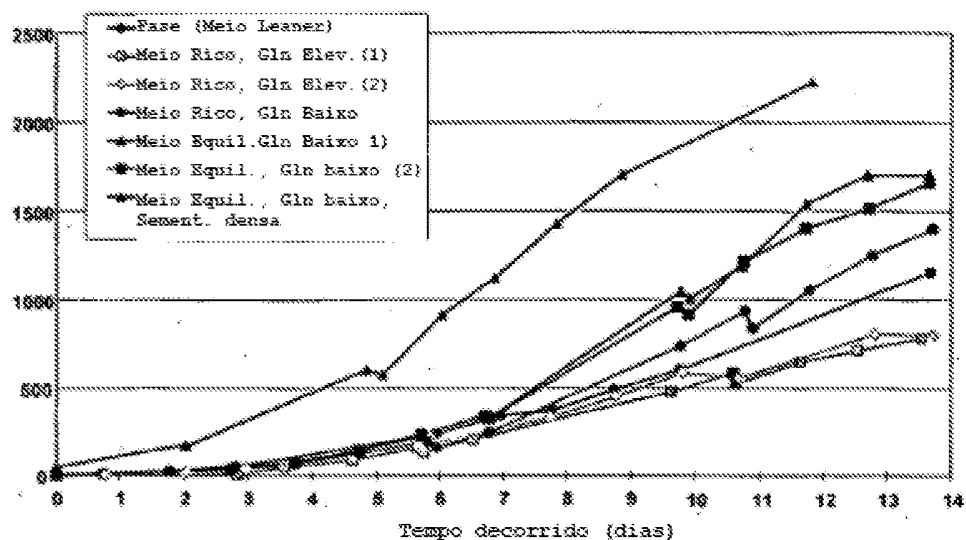


Figura 63. Osmolaridade de culturas anti-ABeta sob várias condições de meios testados.

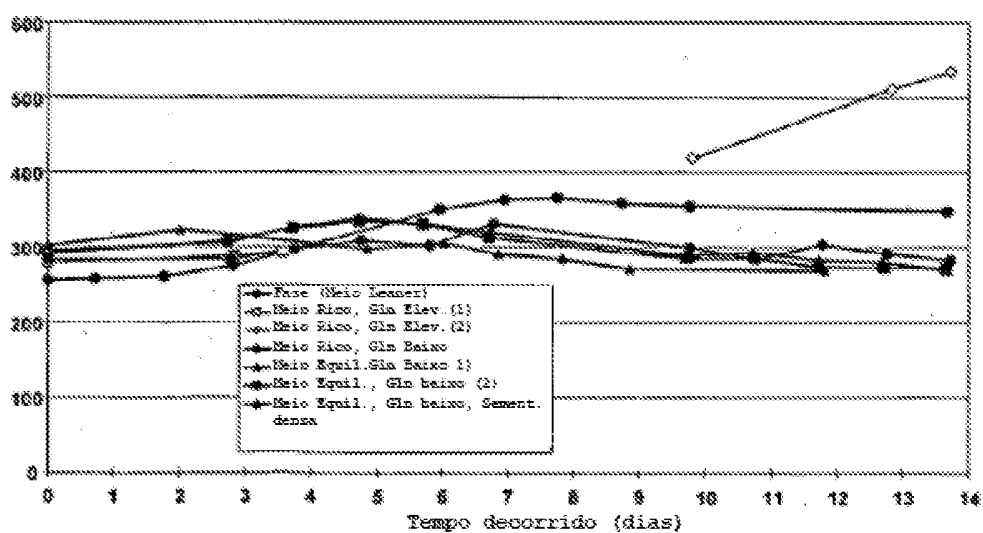


Figura 66. Crescimento de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

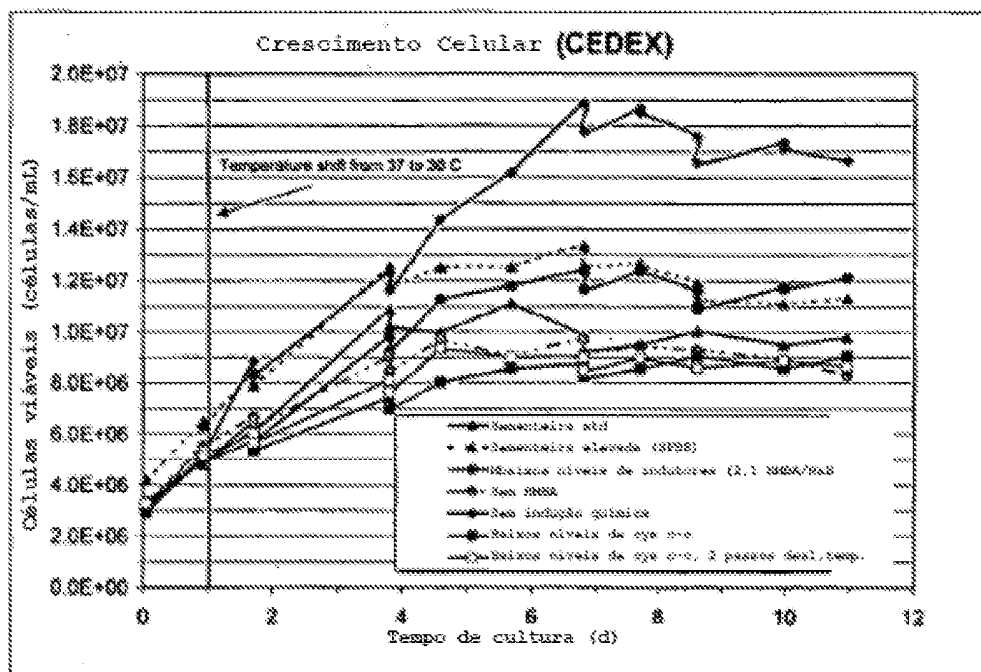


Figura 67. Viabilidade de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

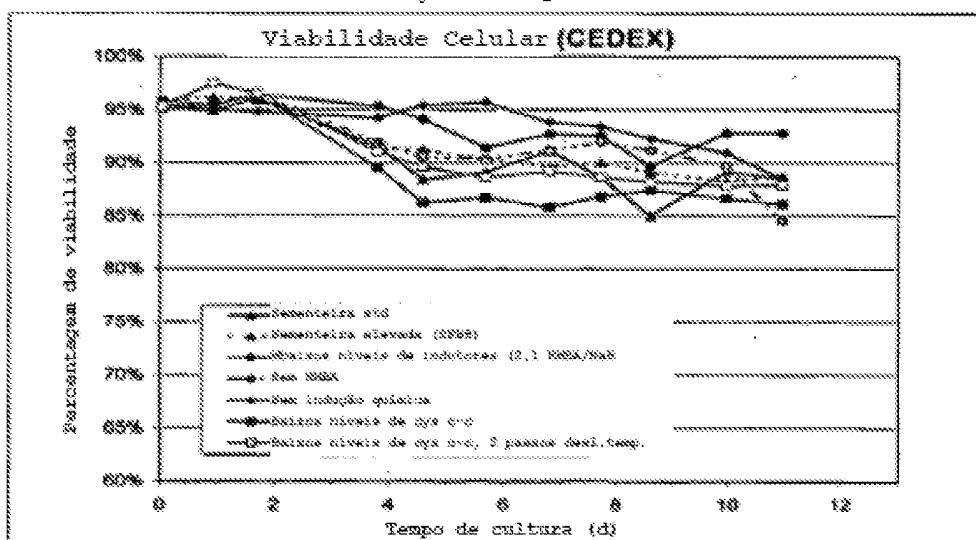


Figura 68. Crescimento de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

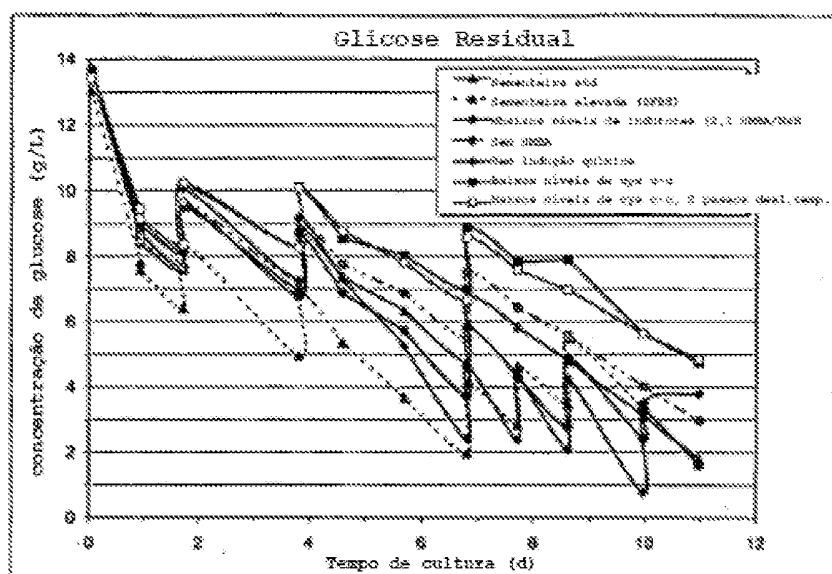


Figura 69. Níveis de glutamina em cultura de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

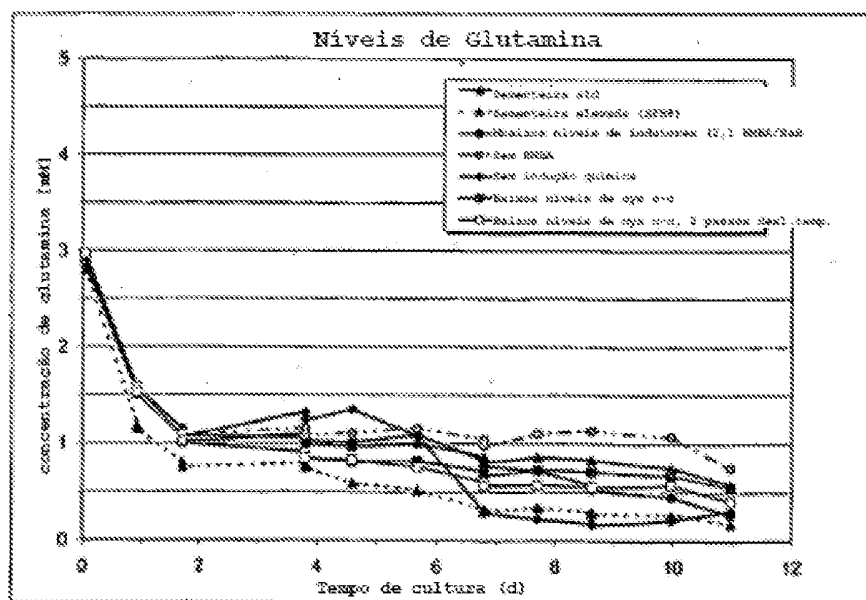


Figura 70. Concentração de lactato em culturas de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

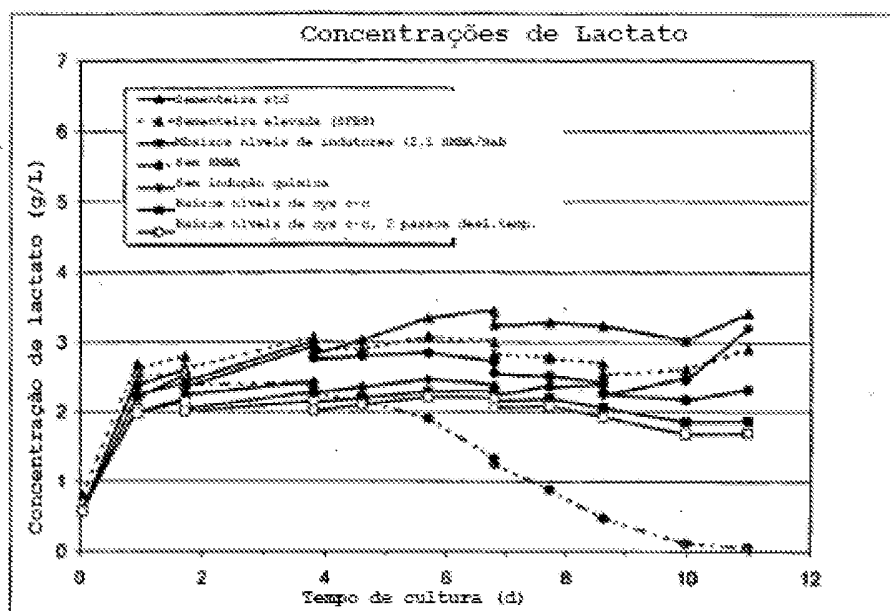


Figura 71. Níveis de amônio em culturas de células que expressam TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

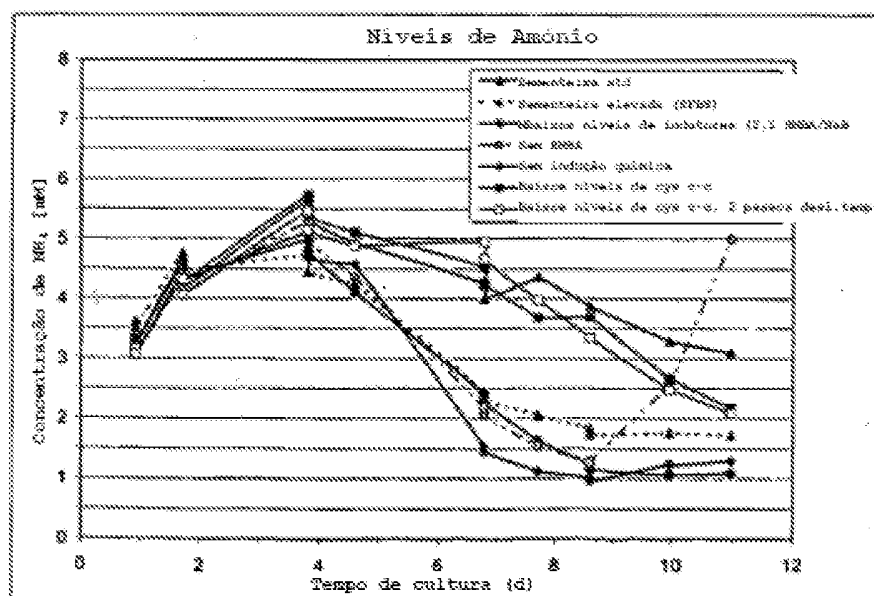


Figura 72. Título relativo de TNFR-Ig sob várias condições experimentais.

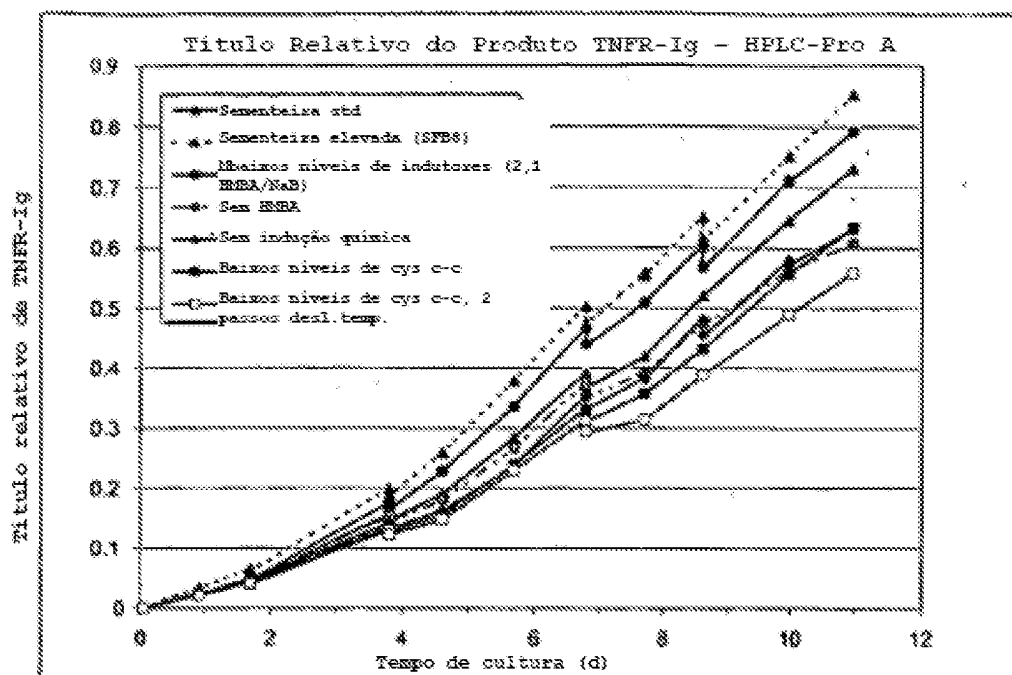


Figura 73. Densidades celulares de células Anti-GDF-8 em Biorreactores de 6 000 L e 1 L

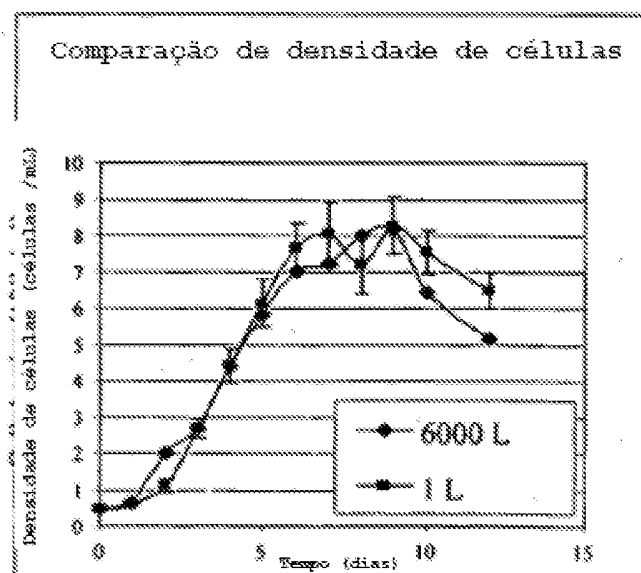


Figura 74. Títulos de células Anti-GDF-8 Cultivados em Biorractores de 6 000 L e 1 L

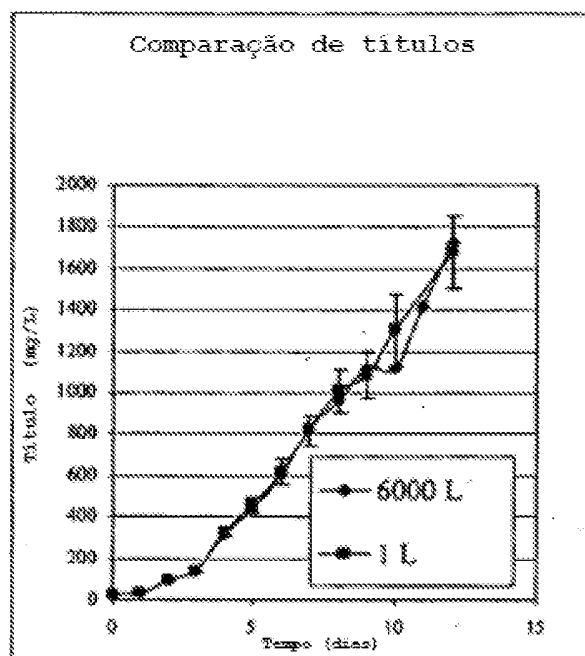


Figura 75. Níveis de lactato de células Anti-GDF-8 cultivadas em Biorractores de 6 000 L e 1 L

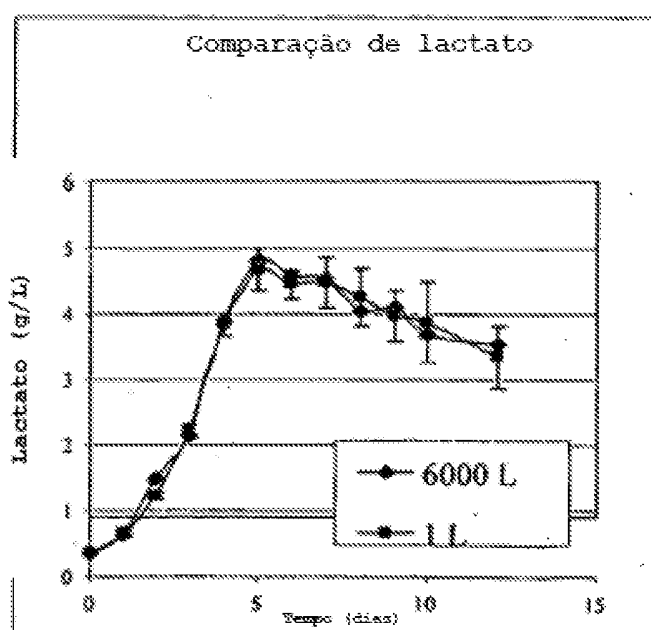
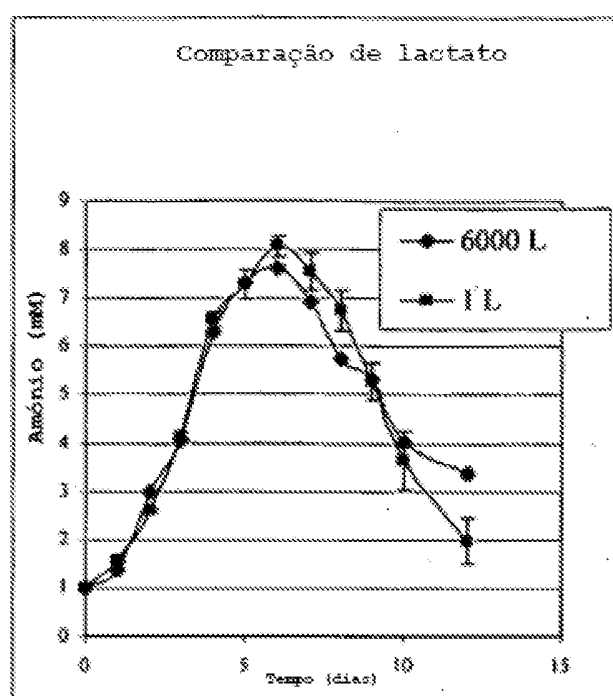


Figura 76. Níveis de amônio de células Anti-GDF-8 cultivadas em Biorreactores de 6 000 L e 1 L



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 20040142382 A
- EP 417583 A
- EP 417014 A
- EP 117060 A, Levinson
- EP 117058 A
- US 4399216 A
- US 5871999 A
- US 4532811 A
- US 20040142382 A1
- WO 0246237 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- MILSTEIN et al. *Nature*, 1983, vol. 537, 3853
- NAISMITH ; SPRANG. *J. Inflamm.*, 1995, vol. 47 (1-2), 1-7
- DIJKEMA et al. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 761
- GORMAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 6777
- BOSCHART et al. *Cell*, 1985, vol. 41, 521
- SAMBROOK ; FRITSCH ; MANIATIS. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- GETTING et al. *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625
- MANTEI et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46
- GRAHAM ; VAN DER ERB. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457
- HAWLEY-NELSON. *Focus*, vol. 15, 73
- KEOWN et al. *Methods in Enzymology*, 1989
- KEOWN et al. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537
- MANSOUR et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352
- OKAYAMA et al. *Mol. Cell Biol.*, 1985, vol. 5, 1136-1142
- THOMAS et al. *Cell*, 1987, vol. 51, 503-512
- CHO ; URLAUB ; CHASIN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216
- MATHER. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251
- MATHER et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68
- H.J. MORTON. *Vitro*, 1970, vol. 6, 89-108
- R.G. HAM. *Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA)*, 1965, vol. 53, 288-293
- G.E. MOORE et al. *J. Am. Medical Assn.*, 1967, vol. 199, 519-24
- SCOPES. *Protein Purification Principles and Practice*. Springer-Verlag, 1987
- *Protein Expression : A Practical Approach*. Oxford Univ Press, 1999
- *Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology*. Academic Press, 1997, vol. 182
- *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State University Press, 2001
- BOGHEART et al. *Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts*. *Clin. Can. Res.*, 2004, vol. 10, 4538-49