

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.04.25	(73) Titular(es): NOVARTIS AG	
(30) Prioridade(s): 2010.04.26 US 327836 P	LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL	CH
(43) Data de publicação do pedido: 2013.03.06	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.01.21	CHRISTIAN LEIST	CH
091/2015	PETRA MEISSNER	CH
	JÖRG SCHMIDT	CH
	(74) Mandatário:	
	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS APERFEIÇOADO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MEIO OTIMIZADO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS, BEM COMO A PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS. O MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS É DISTINGUIDO POR UMA RAZÃO SOW DE IÕES DE SÓDIO PARA POTÁSSIO, E ELE REFERE-SE AINDA AO MÉTODO PARA PRODUZIR POLIPEPTÍDEOS USANDO TAIS MEIOS DE CULTURA DE CÉLULAS. EM OUTRO ASPECTO, O MÉTODO PARA PRODUZIR POLIPEPTÍDEOS USANDO PODE COMPREENDER TAMBÉM UM DESLOCAMENTO DE TEMPERATURA E/OU UM DESLOCAMENTO DE PH PARA OTIMIZAR AINDA MAIS O CRESCIMENTO E O RENDIMENTO DO PRODUTO.

RESUMO**"MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS APERFEIÇOADO"**

A presente invenção refere-se a um meio otimizado para o crescimento de células de mamíferos, bem como a produção de polipeptídeos. O meio de cultura de células é distinguido por uma razão Sow de iões de sódio para potássio, e ele refere-se ainda ao método para produzir polipeptídeos usando tais meios de cultura de células. Em outro aspecto, o método para produzir polipeptídeos usando pode compreender também um deslocamento de temperatura e/ou um deslocamento de pH para otimizar ainda mais o crescimento e o rendimento do produto.

DESCRIÇÃO**"MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS APERFEIÇOADO"****[Campo Técnico da Invenção]**

A presente invenção refere-se ao campo genérico da biotecnologia, particularmente o cultivo de células e seu uso para a produção de polipeptídeos em escala industrial.

A presente invenção fornece meios de cultura de células, que são apropriados para o cultivo de células com alta viabilidades de células, de preferência células de mamíferos tais como células CHO, e que são caracterizados pela sua razão molar de iões de sódio para potássio. Os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção permitem obter altas produtividades de polipeptídeos quando usados para a produção de um polipeptídeo, particularmente por expressão recombinante de polipeptídeos em sistemas de cultura de células de mamíferos, particularmente em escala industrial.

[Antecedentes Técnicos da Invenção]

A preparação de polipeptídeos usando tecnologia recombinante se desenvolveu em um procedimento padrão

durante as duas últimas décadas. O acesso a polipeptídeos recombinantes clonando os genes que codificam o respectivo polipeptídeo, e em seguida, por transformação subsequente de hospedeiros de expressão apropriados com o gene a ser expressado e produção final e purificação do produto polipeptídeo recombinante proporcionou acesso a uma classe inteiramente nova de produtos terapêuticos biologicamente desenhados e produzidos.

Os compostos farmacêuticamente ativos têm sido preparados em números crescentes na indústria farmacêutica usando tecnologia de DNA recombinante, e em seguida, por processos de produção desenvolvidos no campo da bio-engenharia.

Tais produtos biológicos incluem anticorpos monoclonais, que se tornaram em opções de tratamento importantes em vários campos médicos, incluindo doenças auto-imunes, distúrbios inflamatórios, imunossupressão, oncologia ou campos similares.

O desenvolvimento desses produtos terapêuticos de origem biológica requer a produção em escala industrial proporcionando desta forma acesso a grandes quantidades de polipeptídeos recombinantes. Os sistemas de expressão preferidos são culturas de células de mamíferos que são melhores do que a maioria dos sistemas eucarióticos baseados em células de insetos, levedura ou similares, ou mesmo sistemas de expressão procarióticos tradicionais.

Entretanto, a cultura de células de mamíferos inclui tremendos desafios especialmente em escala industrial. As instalações de produção para cultura de células de mamíferos requerem otimização perfeita de muitas condições do processo.

Um dos parâmetros mais importantes do processo para controlar o processo de produção global é o meio no qual as células são desenvolvidas e ocorre a produção de polipeptídeos. Os meios de cultura de células apropriados devem produzir culturas de células com todas as substâncias nutrientes necessárias, o que é especialmente difícil caso nenhum componente de origem animal, tal como soro ou proteínas, *e.g.* fatores de crescimento, seja adicionado aos meios.

Consequentemente, uma grande variedade de meios de cultura de células foi desenvolvida em alguns casos, tendo o foco sido baseado na composição genérica e meios com uma grande variedade de substâncias diferentes, foi proposta (US 5.122.469, EP 0 481 791, EP 0 283 942). Em outros casos, ingredientes específicos foram sugeridos para aperfeiçoar a cultura de células. As principais metas foram melhorar o crescimento ou sobrevivência das células, ou a quantidade ou qualidade de polipeptídeos expressados de forma recombinante.

Os aspectos tratados nos documentos da técnica

anterior são de entre outros a contribuição de iões vestigiais (e.g. WO 02/066603, EP 0 872 487, EP 1160 314 A2), vitaminas tais como ácido ascórbico (e.g. US 6.838.284), hidratos de carbono (e.g. EP 1 543 106) ou o teor de aminoácidos específicos em combinação com características adicionais (e.g. EP 0 501 435, US 5 830 761, US 7 294 484).

Os principais iões e suas concentrações em meios de cultura de células são largamente mantidos constantes e inalterados. Todos os tipos clássicos de meios tais como e.g. DMEM, DMEM/F12, BME ou RPMI 1640 usam gamas relativamente estreitas e fixas para as concentrações de iões majoritários em geral e os catiões monovalentes Na^+ e K^+ em particular. Isto está em linha com o fato de que o equilíbrio iónico dos iões majoritários em geral e os catiões monovalentes Na^+ e K^+ em particular é uma propriedade bastante universal de quase todas as células de mamíferos.

Mais detalhadamente, o gradiente transmembrana de iões de sódio e potássio é uma propriedade básica de células de mamíferos com alta concentração de iões de potássio dentro da célula e alta concentração de iões de sódio fora da célula. A bomba de sódio/potássio é uma das principais bombas de iões da membrana celular, que é eletrogênica e contribui para estabelecer e manter o respectivo gradiente iónico de sódio e potássio através da membrana (Kaplan, "Membrane cation transport and the

control of proliferation of mammalian cells", *Annu. Rev. Physiol.*, 40:19-41 (1978)). A bomba usa cerca de 30% da energia das células e é um dos principais processos de consumo de energia das células. Muitos processos bioquímicos básicos estão acoplados ao gradiente eletroquímico de iões de sódio, tal como e.g. o permutador de Na^+/Ca^+ ou o transporte de aminoácidos para dentro de células. As concentrações de iões de sódio e potássio fora de uma célula são, portanto, parâmetros de suprema importância que influenciam o gradiente destes iões através da membrana e o estado básico da célula.

De acordo com a concentração típica de iões de sódio dentro e fora de uma célula de mamífero genérica (Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* (1994)), na maioria das vezes concentrações de sódio de cerca de 145 mM são escolhidas junto com concentrações de iões de potássio de cerca de 5 mM. Para a maioria dos tipos de meios, isto resulta em uma razão entre iões de sódio e potássio que fica na gama entre cerca de 20-30 (vide Tabela 1 abaixo e e.g. US 5 135.866).

Apenas poucos documentos das técnicas anteriores descrevem meio de cultura de células apropriados para cultura de células de mamíferos ou a produção de proteínas recombinantes mencionando razões específicas de iões de sódio para potássio. Estes documentos sugerem composições de meios com razões especificamente altas na gama alta de cerca de 30,7 em US 5 232 848, ou em uma gama entre cerca

de 25 e 35, atingindo assim valores ainda mais altos (EP 0 283 942, EP 0 389 786). Outros meios tais como HAM's-F12 ou meios de cultura de células animais, como proposto em US 2008/0261259, também sugerem especificamente valores mais altos (e.g. 27,9 a 57,5, em US 2008/0261259). Apenas muito poucos documentos descrevem meios que têm uma razão iões de sódio para potássio abaixo de 20, tal como 11,5-30 (US 7 294 484) ou uma razão de cerca de 15 (US 6 180 401). Estes documentos ainda usam razões mais altas do que 10 e também não designam uma vantagem específica para mudar este parâmetro para os valores mencionados.

Além dos efeitos relacionados ao equilíbrio iónico entre iões específicos, também a contribuição dos principais iões da osmolalidade global do meio tem de ser considerada. A maioria dos meios convencionais tais como e.g. DMEM, MEM alfa, ou meio de Fischer são caracterizados por uma alta quantidade de cloreto de sódio.

O documento no WO 02/101019 trata o alto teor de glicose no meio em combinação com o uso de uma osmolalidade mais alta. A alta concentração de glicose entre cerca de 2-40 g/L foi atingida reduzindo ou mesmo eliminando completamente agentes tais como cloreto de sódio mantendo desta forma a osmolalidade em um dado nível.

Considerando os desafios acima e as desvantagens existentes, há uma necessidade continuada no campo de biotecnologia industrial obter meios de cultura de células

aperfeiçoados que permitem produzir polipeptídeos re-combinantes em uma escala industrial.

[Sumário da Invenção]

A presente invenção fornece meios de cultura de células com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, isto é, uma razão de Na^+/K^+ abaixo de um valor de cerca de 10. Isso é conseguido por meio da diminuição do número de iões de sódio totais e aumento do teor de iões de potássio totais. Descobriu-se que essa baixa razão exerce vários efeitos benéficos, particularmente melhor viabilidade, crescimento e produtividade de células de mamíferos.

Assim sendo, a presente invenção fornece um meio de cultura de células otimizado para o desenvolvimento de células de mamíferos, bem como para a produção de polipeptídeos, que se distingue por uma razão de iões de sódio para potássio, medida como teor molar, entre cerca de 10 para 1 e cerca de 1 para 1, alternativamente entre cerca de 8 para 1 e cerca de 6 para 1. A forma de realização desta característica pode incluir concentrações de iões de sódio na gama entre 50 e cerca de 90 mM e de iões de potássio entre cerca de 8 e cerca de 12 mM.

Em outro aspecto, a otimização do meio de cultura de células inclui selecionar um teor total de aminoácidos entre cerca de 40 mM e cerca de 100 mM, alternativamente entre cerca de 50 mM e cerca de 100 mM. Esta característica

pode ser combinada com uma baixa razão molar específica entre a concentração total de iões e total de aminoácidos de cerca de 1,9 a cerca de 4.

Em outro aspecto, a invenção fornece um processo no qual o meio de cultura de células de acordo com a invenção é usado para cultivar células de mamíferos para a produção de um polipeptídeo recombinante desejado. O processo envolve cultivar células de mamíferos em um meio de acordo com a invenção e expressar o polipeptídeo recombinante.

Algumas formas de realização do processo incluem condições de cultura nas quais a temperatura e/ou o pH do meio são deslocados pelo menos uma vez durante a cultura. Como outra opção a alimentação é realizada por um processo de alimentação descontínua.

Os produtos polipeptídeos desejados incluem polipeptídeos glicosilados e particularmente anticorpos e fragmentos de anticorpos.

As células de mamíferos usadas no processo da presente invenção são, de preferência, selecionadas no grupo que consiste em células CHO, células HEK e células SP2/0.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para a produção de um meio de cultura de

células de acordo com a invenção, onde os diferentes componentes são misturados uns com os outros.

Particularmente, a concentração de cloreto de sódio adicionado à composição do meio pode ficar na gama entre cerca de 7 e cerca de 15 mM. A concentração de cloreto de potássio pode ser adicionada à composição do meio para ficar em uma gama entre cerca de 8 e cerca de 12 mM.

[Breve Descrição dos Desenhos]

A invenção será mais bem entendida fazendo referência aos exemplos e figuras que se seguem. Os exemplos, entretanto, não são intencionados para limitar o âmbito da invenção.

A figura 1 ilustra a densidade de células viáveis de um clone de células CHO produtoras de mAb1 em função do tempo de cultura em frascos de cultura com agitação (vide Exemplo 1) usando um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, como descrito pela invenção. Além disso, o efeito de uma temperatura constante versus um deslocamento de temperatura está representado.

A figura 2 ilustra a viabilidade de um clone de células CHO produtoras de mAb1 (vide Exemplo 1), usando um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, e o efeito de uma temperatura constante versus um deslocamento de temperatura no Dia 3.

A figura 3 ilustra o título do produto em função do tempo de cultivo para culturas em frascos com agitação de um clone de células CHO produtoras de mAb1 com e sem um deslocamento de temperatura (vide Exemplo 1). As células foram cultivadas em um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, de acordo com a invenção.

A figura 4 ilustra a concentração de lactato em função do tempo de cultura em um clone produtor de mAb2 (vide Exemplo 2). As células foram cultivadas em um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, de acordo com a invenção.

A figura 5 ilustra a densidade de células viáveis em função do tempo de cultura em um biorreator de 300 L com um clone de células CHO. As condições da cultura incluíram uma etapa de temperatura (Dia 5) e dois deslocamentos de pH devido à regulação do pH com um de ajuste e banda morta (vide também Exemplo 2). As células foram cultivadas em um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, de acordo com a invenção.

A figura 6 ilustra o título do produto em função de tempo de cultura em um biorreator de 300 L com um clone de células CHO. O processo combinou uma temperatura com dois deslocamentos de pH (vide também figura 5 e Exemplo 2). As células foram cultivadas em um meio com uma razão de Na^+/K^+ reduzida, de acordo com a invenção.

[Descrição Detalhada da Invenção]

Os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção são usados para desenvolver células de mamíferos, de preferência, células CHO, células HEK e células SP2/0, e para a produção de polipeptídeos recombinantes, usando tais células. As células CHO são especialmente preferidas. O termo "meio de cultura de células" refere-se a uma solução aquosa de nutrientes que podem ser usados para desenvolver células durante um período de tempo prolongado. Tipicamente, os meios de cultura de células incluem os seguintes componentes: uma fonte de energia que será usualmente um composto hidrato de carbono, de preferência glicose, aminoácidos, de preferência o conjunto básico de aminoácidos, incluindo aminoácidos essenciais, vitaminas e/ou outros compostos orgânicos que são necessários em concentrações baixas, ácidos graxos livres, e compostos inorgânicos, incluindo microelementos, sais inorgânicos, compostos de tamponamento e nucleosídeos e bases.

O meio de cultura de células de acordo com a presente invenção pode ser usado em vários processos de cultura de células. O cultivo de células pode ser conduzido em cultura aderente, por exemplo em cultura de monocamada ou, de preferência, em cultura em suspensão.

O uso de meios de cultura de células no campo da indústria farmacêutica, por exemplo para a produção de

polipeptídeos recombinantes terapeuticamente ativos, não permite genericamente o uso de qualquer material de origem biológica devido a problemas de segurança e contaminação. Portanto, o meio de cultura de células de acordo com a invenção é, de preferência, um meio isento de soro e/ou proteínas. O termo "meio isento de soro e/ou proteínas" representa um meio completamente definido quimicamente, não contendo aditivos de origem animal tais como hidrolisados teciduais, e.g. soro fetal bovino ou similares. Além disso, proteínas, especialmente fatores de crescimento tais como insulina, transferrina, ou similares, de preferência, também não são adicionados à cultura de células de acordo com a presente invenção. De preferência, o meio de cultura de células de acordo com a presente invenção não é também suplementado com uma fonte de proteína hidrolisada tal como peptona de soja, trigo ou arroz ou hidrolisado de levedura, ou similares.

A osmolalidade e o pH dos meios são ajustados para valores que permitem o crescimento das células, e.g. valores entre cerca de pH 6,8 e cerca de pH 7,2. A osmolalidade dos meios no início da cultura é tipicamente entre cerca de 280 e cerca de 365 mOsm, mas pode também aumentar gradualmente durante a cultura, e a adição de soluções alimentadoras até valores menores do que cerca de 600 mOsm/kg. De preferência, os meios de acordo com a presente invenção têm uma osmolalidade inicial entre cerca de 285 e cerca de 365 mOsm/kg.

A temperatura da cultura de células é selecionada em uma gama na qual as células são viáveis e crescem. Uma temperatura típica para a cultura de células fica na gama entre cerca de 30°C e cerca de 38°C. Por exemplo, as células são inicialmente desenvolvidas em temperaturas de cerca de 36 a cerca de 37°C que é ótima para células CHO. Entretanto, a temperatura exata pode ser adaptada às necessidades das células e também mudada durante a cultura para permitir sua viabilidade, crescimento ou produção ótima.

O primeiro aspecto da invenção está relacionado ao equilíbrio iónico entre iões de sódio e potássio na cultura de células. A presente invenção descreve uma razão molar de iões de sódio para potássio que é entre cerca de 10 para 1 e cerca de 1 para 1. Em outras formas de realização da invenção a razão é selecionada entre cerca de 9 para 1 e cerca de 5 para 1. Alternativamente, a razão é entre cerca de 8 para 1 e cerca de 6 para 1.

A concentração dos iões de sódio e potássio e a respectiva razão é aqui definida por intermédio do seu teor molar. A concentração de iões de sódio e potássio é determinada calculando o número total destes iões no meio de crescimento, depois que os respectivos sais foram adicionados e dissolvidos na solução do meio.

Para atingir a concentração necessária de sódio usualmente diferentes sais são adicionados ao meio. São

comumente usados os sais de sódio e.g. NaCl, sais fosfato monobásico ou dibásico de sódio, carbonato de sódio, citrato de sódio, iões vestigiais tais como e.g. selenito de sódio, mas não estão limitados a estes exemplos. Além disso, a base hidróxido de sódio (NaOH) que pode ser adicionada aos meios para ajuste do pH contribui para o teor total de iões de sódio. O termo "ião" a este respeito refere-se ao estado dissociado. Calcular o teor molar de iões significa assim levar em consideração a valência dos iões. O cloreto de sódio (NaCl) 1 mM adicionado um meio contribuiria, portanto, com 1 mM de iões de sódio, enquanto que fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) 1 mM contribuiria consequentemente 2 mM de iões de sódio. De acordo com a invenção, a concentração de sódio usada no meio é selecionada entre cerca de 50 e 90 mM. Alternativamente, a concentração de iões de sódio é selecionada para ser cerca de 65 a cerca de 85 mM.

O sal de potássio que é usado para o meio é tipicamente KCl, mas inclui também e.g. K_2SO_4 ou fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4). O sal de potássio não está limitado a estes exemplos específicos. Alternativamente, a concentração de potássio usada nos meios é entre cerca de 8 e cerca de 12 mM, ou cerca de 10,7 mM.

A Tabela 1 indica exemplos de meios que são usados tradicionalmente para o crescimento de células de mamíferos. Estes meios clássicos tais como DMEM, DMEM/F12, BGJ e outros têm uma razão particularmente alta de iões

Na/K. Os meios de acordo com a presente invenção são caracterizados por uma razão particularmente baixa de Na/K menor do que cerca de 10 para 1 (vide Tabela 2). Os meios de acordo com a presente invenção são apropriados para cultivar células CHO e outras células de mamíferos e apresentam um melhor crescimento das células e/ou permitem melhor produção de polipeptídeos. Dois exemplos desses meios estão indicados na Tabela 3, que representa a composição de dois exemplos de meios e como uma baixa razão Na/K pode ser conseguida. Os efeitos sinérgicos entre baixa razão de íons de sódio para potássio e as outras características dos meios têm mesmo um efeito vantajoso sobre o crescimento de células e produção de proteínas recombinantes.

Além da concentração específica de íons de sódio e potássio e sua razão específica, os presentes meios se distinguem também por uma concentração particularmente baixa de cloreto de sódio (NaCl) que é adicionado à mistura de componentes do meio. De preferência, são usadas concentrações de cerca de 7 a cerca de 15 mM. Esta baixa quantidade de cloreto de sódio é incomum. Em algumas formas de realização da presente invenção, a concentração (em mM) de cloreto de sódio é ainda mais baixa do que a concentração (em mM) do respectivo sal de potássio que é adicionado. Além disso, os meios de acordo com a presente invenção frequentemente apresentam um baixo teor total de íon cloreto. Como ilustrado pelos exemplos da Tabela 2, isto resulta em concentrações iniciais de cloreto entre

cerca de 36 e 46 mM. Na maioria das vezes, os sais inorgânicos tais como NaCl ou CaCl_2 contribuem para este valor, mas também componentes do meio tais como cloreto de sódio, ou aminoácidos tais como, por exemplo, cloridrato de L-histidina ou cloridrato de L-lisina podem acrescentar a concentração total.

Outra vantagem das composições de meios de acordo com a presente invenção é a combinação de uma baixa razão molar de Na/K com uma concentração inicial de aminoácidos na gama entre cerca de 40 mM, alternativamente cerca de 50 mM, e cerca de 100 mM. Os meios clássicos usam comparativamente baixas concentrações de aminoácidos e/ou altas razões de Na/K. A combinação de ambas características podem proporcionar efeitos adicionais que são vantajosos para o crescimento das células e a produção de polipeptídeos.

A Tabela 2 indica diferentes formas de realização desses parâmetros de acordo com a invenção. Além do seu teor total de aminoácidos, os meios apropriados de acordo com a presente invenção, otimizados para o crescimento de células contêm, de preferência, concentrações iniciais de aminoácidos de acordo com as gamas que se seguem.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base livre	4,0-6,0, de preferência, 4,5-5,5
Asparagina, mono-hidratada	3,0-6,0, de preferência, 4,0-5,5
Ácido aspártico	2,5-4,0, de preferência, 3,0-3,6
Glicina	0,3-0,8, de preferência, 0,5-0,7

(continuação)

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Histidina, HCl H ₂ O	0,6-1,0, de preferência, 0,7-0,9
Isoleucina	2,0-5,0, de preferência, 2,9-4,0
Leucina	3,0-7,0, de preferência, 3,5-6,0
Lisina HCl	2,0-4,0, de preferência, 2,5-3,5
Metionina	1,0-1,5, de preferência, 1,2-1,4
Fenilalanina	1,0-2,0, de preferência, 1,3-1,8
Prolina	2,5-6,0, de preferência, 3,0-5,5
Serina	3,0-8,0, de preferência, 4,0-7,0
Treonina	2,0-3,5, de preferência, 2,5-3,1
Triptofano	0,4-1,0, de preferência, 0,5-0,8
Valina	2,5-5,0, de preferência, 3,0-4,5
Tirosina	1,0-2,0, de preferência, 1,2-1,8
Cisteína	0,5-1,0, de preferência, 0,6-0,9
Glutamina	5,5-9,5, de preferência, 6,2-8,2

Os meios da presente invenção especificados ainda por aminoácidos como definido na tabela acima podem ser usados favoravelmente nos processos aperfeiçoados de cultura de células de acordo com a presente invenção.

Em uma forma de realização particularmente preferida, os meios de acordo com a presente invenção são otimizados para a produção e, de preferência, contêm concentrações iniciais de aminoácidos de acordo com as gamas que se seguem.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base livre	4,0-6,0, de preferência, 4,5-5,5
Asparagina, mono-hidratada	9,0-11,0, de preferência, 9,5-10,5
Ácido aspártico	2,5-4,0, de preferência, 3,0-3,6
Glicina	0,3-0,8, de preferência, 0,5-0,7
Histidina, HCl H ₂ O	1,0-1,5, de preferência, 1,1-1,3
Isoleucina	5,5-7,0, de preferência, 6,0-6,9
Leucina	8,0-10,0, de preferência, 9,0-9,2
Lisina HCl	3,0-6,0, de preferência, 4,0-5,0
Metionina	1,5-2,5, de preferência, 1,5-2,0
Fenilalanina	2,0-3,5, de preferência, 2,5-3,0
Prolina	7,5-9,0, de preferência, 8,0-8,5
Serina	10,5-13,0, de preferência, 11,0-11,9
Treonina	3,5-5,5, de preferência, 4,0-5,0
Triptofano	0,9-2,0, de preferência, 1,0-1,4
Valina	5,5-7,5, de preferência, 6,0-6,8
Tirosina	1,0-3,0, de preferência, 2,0-2,5
Cisteína	0,5-2,0, de preferência, 1,0-1,3
Glutamina	5,5-9,5, de preferência, 6,2-8,2
Ácido glutâmico	0,5-2,5, de preferência, 1,0-1,2

Os meios da presente invenção que contêm aminoácidos como definido na tabela acima podem ser usados favoravelmente nos processos aperfeiçoados de cultura de células de acordo com a presente invenção.

Em outro aspecto da invenção, além da razão específica entre iões de sódio e potássio, também o

equilíbrio global entre concentrações iónicas totais (contribuindo para a intensidade iónica global do meio), e os aminoácidos no meio é importante. A razão entre a concentração total de iões e os aminoácidos no meio nutriente de crescimento é dominada mormente pelos sais inorgânicos majoritários tais como *e.g.* cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, e outros, que são ingredientes importantes da maioria dos tipos de meios de cultura de células para células animais. Além disso, sais de iões vestigiais, aminoácidos ou vitaminas contribuem para este valor (*e.g.* sulfato cúprico, cloridrato de L-arginina, cloridrato de L-histidina, cloreto de colina, D-pantotenato de cálcio e outros). Pode ser vantajoso para as células também ajustar as concentrações destes iões. Portanto, define-se aqui a concentração total de iões como a soma de todos os sais orgânicos e inorgânicos principais adicionados ao meio, que são ionizáveis em uma solução aquosa do meio mais a base NaOH e o ácido HCl. Micro-elementos não estão incluídos. Assim sendo, 1 mM de NaCl, NaOH ou os sais orgânicos tais como Lisina-HCl ou cloreto de colina contribuiriam cada 2 mM de iões. 1 mM de $MgCl_2$ consequentemente acrescentaria 3 mM de iões, enquanto que 1 mM do sal orgânico citrato trissódico contribui com 4 mM.

De acordo com a presente invenção, a razão molar entre iões e aminoácidos é assim seleccionada para ser entre cerca de 1,9 e 4. Em algumas formas de realização a razão é seleccionada para ficar na gama entre cerca de 2,0 e 3,9. Estas baixas razões específicas não são atingidas apenas

por um teor relativamente alto de aminoácidos, mas também por um teor relativamente baixo de iões no meio. O teor de iões no meio é genericamente menor do que 250 mM. Por exemplo, os valores são selecionados para serem entre cerca de 150 e 220 mM, ou alternativamente, entre cerca de 170 e 200 mM.

Em suma, as características específicas dos meios descritas têm efeitos importantes sobre o metabolismo celular e fisiologia, enquanto que, ao mesmo tempo, afetando também os parâmetros genéricos tais como osmolaridade ou e.g. a disponibilidade de componentes nutricionais. O equilíbrio das diferentes características do meio leva assim a propriedades singulares que levam a efeitos sinérgicos inesperados para as células.

Os meios com baixa razão Na/K são genericamente apropriados para o crescimento de diferentes células de mamíferos e a fabricação de polipeptídeos/proteínas recombinantes em produção em larga escala. Os polipeptídeos e proteínas, como aqui usados, se referem a polipeptídeos recombinantes que são expressados pela respectiva célula de mamífero depois da transfecção das células com a construção ou construções de DNA que codificam o produto de interesse. Qualquer polipeptídeo que pode ser expressado em uma célula hospedeira pode ser produzido de acordo com a presente invenção. Depois que os polipeptídeos foram produzidos pelo processo da presente invenção, eles são secretados de forma extracelular, ligados às células ou permanecem nas células,

dependendo do produto específico e da linhagem de células usada. O produto polipeptídeo pode ser recuperado a partir do sobrenadante da cultura diretamente ou depois da lise das células por procedimentos usuais. Além disso, o isolamento e purificação adicionais são feitos por técnicas usuais conhecidas pelos versados nessa área. O polipeptídeo da invenção pode ser incluído em uma composição farmacêutica.

Outro aspecto da invenção refere-se a um processo para a produção de um polipeptídeo recombinante, compreendendo cultivar células de mamíferos em um meio de acordo com a presente invenção, onde as condições de cultura compreendem pelo menos um deslocamento de temperatura e pelo menos um deslocamento de pH.

Consequentemente, em outro aspecto da invenção, pode ser vantajoso mudar a temperatura durante o curso da cultura e incluir um ou mais deslocamentos de temperatura que são iniciados em certos pontos no tempo. Uma mudança/deslocamento na temperatura não se refere a oscilações espontâneas na temperatura, mas mudanças na temperatura de pelo menos 1°C, ou alternativamente, pelo menos 2°C que são intencionais, e onde a segunda temperatura é mantida por pelo menos um dia. Uma mudança/deslocamento pode ser implementada alterando o ponto de ajuste da cultura. O *timing* é dependente do estado de crescimento da cultura, um número predeterminado de dias depois do início da cultura ou as necessidades metabólicas

das células. Assim sendo, a temperatura pode ser deslocada em um período de cerca de 1 a 10 dias depois do início da cultura. De preferência, um deslocamento da temperatura é feito durante a fase de crescimento das células ou lá pelo final desta fase. Dependendo do volume do recipiente de cultura, a mudança pode ocorrer rapidamente ou mais lentamente e dura várias horas. Em um exemplo, tal deslocamento na temperatura é implementado durante a fase de crescimento da cultura quando a densidade é entre cerca de 40 e cerca de 90% da densidade máxima. Em um exemplo, a primeira temperatura é entre cerca de 33 e cerca de 38°C. A segunda temperatura é entre cerca de 30 e cerca de 37°C, ou alternativamente, entre cerca de 32 e cerca de 34°C.

Em outro aspecto da presente invenção, pode ser vantajoso mudar o pH durante o curso da cultura, incluindo um ou mais deslocamentos de pH. Em outros aspectos da invenção, os deslocamentos na temperatura podem ser também combinados com um ou mais deslocamentos no pH. Embora o pH (e.g. pH 7,0) seja escolhido para ser favorável para a rápida expansão das células, é vantajoso modificar o pH da cultura, depois que uma certa densidade de células é atingida. Esta mudança ou deslocamento no pH é acompanhada pela mudança do ponto de ajuste do pH do recipiente do biorreator/cultura ou pela definição de um ponto de ajuste do pH em combinação com uma banda morta. Uma mudança do pH não se refere a pequenas oscilações no pH, ela se refere em vez disso a uma mudança intencionada. O segundo valor do pH (e.g. 6,8) é selecionado para reduzir a morte celular e

para permitir altas taxas de produção específica por células de polipeptídeos com a qualidade adequada. O segundo pH pode ser mantido até o final da cultura ou até que deslocamentos de pH adicionais tenham sido introduzidos. Em uma forma de realização, pode ser útil mudar o pH em pelo menos 0,2. Em uma forma de realização, o primeiro pH é selecionado para ficar na gama entre pH 6,8 e 7,5. Em outra modalidade, o primeiro pH é selecionado para ficar na gama entre pH 6,8 e 7,2. O segundo valor do pH que é atingido depois de um deslocamento no pH pode ficar na gama entre pH 6,0 e pH 7,5, ou alternativamente, entre 6,5 e 6,8.

O meio de cultura de células de acordo com a presente invenção pode ser usado em vários processos de cultura de células. O cultivo de células pode ser conduzido em cultura aderente, por exemplo em cultura de monocamada ou, de preferência, em cultura em suspensão.

O cultivo em larga escala de células pode ser usado, por exemplo pelos vários processos de fermentação estabelecidos na biotecnologia industrial. Processos de cultura de células contínuos e descontínuos podem ser utilizados usando os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção. Outras tecnologias de reatores conhecidas, e.g. tecnologias de perfusão ou similares também podem ser utilizadas. Processos descontínuos são uma forma de realização preferida.

A cultura de células em descontínuo inclui cultura de alimentação descontínua ou cultura descontínua simples. O termo "cultura de células de alimentação descontínua" refere-se à cultura de células na qual as células de mamíferos e o meio de cultura de células são supridos para o recipiente da cultura inicialmente e nutrientes da cultura adicionais são alimentados continuamente ou em incrementos distintos para a cultura durante o processo de cultura com ou sem colheita periódica de células e/ou produto antes do término da cultura. O termo "cultura descontínua simples" refere-se a um procedimento no qual todos os componentes para a cultura de células, incluindo as células de mamíferos e o meio de cultura de células são supridos para o recipiente de cultura no início do processo de cultura.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a alimentação das células é feita em um processo de alimentação descontínua. Tal alimentação é benéfica para as células para substituir componentes e nutrientes do meio que estão esgotados nos meios durante o processo de cultura. Tipicamente, as soluções de alimentação compreendem aminoácidos, pelo menos um hidrato de carbono como uma fonte de energia, microelementos, vitaminas ou iões específicos. As soluções de alimentação são adicionadas dependendo das necessidades das células, que são baseadas em um programa predeterminado que foi determinado para a linhagem específica de células ou clone

de célula e produto ou medidas durante o processo de cultura. É particularmente vantajoso usar soluções de alimentação concentradas para evitar um grande aumento do volume e diluição do meio. Em algumas modalidades preferidas, pode ser útil também ter pelo menos duas soluções de alimentação diferentes. Isto permite a dosagem independente de dois ou mais grupos de nutrientes e componentes para as células, e assim sendo, um melhor ajuste das condições de alimentação referentes ao ótimo suprimento de certos nutrientes. Em outra modalidade da invenção, uma das duas soluções de alimentação adicionadas ao meio de cultura de células é uma alimentação que compreende o dipeptídeo cisteína e o aminoácido tirosina. De preferência, a alimentação contém o dipeptídeo e o aminoácido tirosina em concentrações respectivas na gama de cerca de 6,5 g/L e cerca de 8,0 g/L e na gama de cerca de 9 g/L e cerca de 11 g/L em uma solução aquosa em um pH básico maior do que 10. Em uma forma de realização específica, a alimentação concentrada compreende o dipeptídeo cisteína e o aminoácido tirosina em concentrações respectivas de 10,06 g/L de L-tirosina e 7,25 g/L de cisteína em um pH acima de 10.

O meio de alimentação que compreende cisteína e tirosina, como descrito acima, pode ser adicionado baseado no consumo medido dos respectivos aminoácidos ou de acordo com um programa fixo a e.g. cerca de 0,2 a cerca de 0,8% em peso do peso inicial do meio de cultura de células por dia,

de preferência cerca de 0,4% em peso do peso inicial do meio de cultura de células por dia.

Em alguns exemplos, a outra solução de alimentação contém todos os outros aminoácidos que também estão presentes no meio básico exceto tirosina e cisteína. Em alguns exemplos, esta solução de alimentação adicional pode consistir em componentes selecionados específicos tais como e.g. aminoácidos ou hidratos de carbono. Em outra modalidade preferida da invenção, este meio de alimentação concentrado contém, de preferência, aminoácidos selecionados de acordo com as gamas de concentração que se seguem.

Aminoácidos	Meio de alimentação Conc. (mmol/L)
Arginina, base livre	12,0 - 17, de preferência 13,5 -16,0
Histidina, HCl H ₂ O	5,5 - 7,5, de preferência 5,9 - 7,0
isoleucina	21 - 28,0, de preferência 22,0 - 27
Leucina	32 - 42, de preferência 34,5 - 40,0
Lisina HCl	17,0 - 22,0, de preferência 17,5 - 21,5
Metionina	5,5 - 8,0, de preferência 6,0 - 7,5
Fenilalanina	8,5 - 12,0, de preferência 9,0 - 10,5
Prolina	18,0 - 24, de preferência 18,5 - 22,0
Serina	39,0-49,0, de preferência, 39,5-46,5
Treonina	14,5-19,0, de preferência, 15,0-18,5
Triptofano	3,0-5,0, de preferência, 3,5-4,9
Valina	23,0-29,0, de preferência, 23,8-27,5
Glutamina	175,5-220,0, de preferência, 176,0-201

De preferência, também hidratos de carbono, tais como glicose, são adicionados a este meio de alimentação concentrado, sendo as concentrações preferidas entre cerca de 1200 e cerca de 1400 mmol/L, ou alternativamente, entre cerca de 1300 e cerca de 1395 mmol/L.

O meio de alimentação como logo acima, de preferência incluindo um hidrato de carbono, tal como glicose, pode ser adicionado baseado no consumo medido dos respectivo aminoácidos ou de acordo com um programa fixo a e.g. cerca de 1 a cerca de 4%, em peso, do peso inicial do meio de cultura de células por dia, de preferência a cerca de 2%, em peso, do peso inicial do meio de cultura de células por dia.

As células cultivadas no meio de cultura de células de acordo com a presente invenção incluem células de mamíferos e não mamíferos. As células de não mamíferos incluem células de insetos ou similares. Entretanto, as células de mamíferos são preferidas. Os termos "célula", "linhagem de célula" e "cultura de célula" podem ser aqui utilizados de forma intercambiável.

Os exemplos de células de mamíferos incluem retinoblastos humanos; células de carcinoma cervical humano, linhagem renal embrionária humana, células pulmonares humanas, células hepáticas humanas, células PER.C6 (uma linhagem de células derivadas de retinoblastos

humanos), linhagem de hepatoma humano e linhagens de células humanas tais como AGE1.HN; linhagem CV1 renal do macaco transformada por SV40; células renais do macaco, células renais do macaco verde africano, células do ovário do *hamster* chinês/-DHFR, células renais do hamster bebê; células de Sertoli do ratinho; células de tumor mamário do ratinho, células renais caninas; células hepáticas do rato Buffalo; células TRI; células MRC 5; células FS4; as células CHO são uma linhagem de células preferidas para praticar a invenção.

Em uma forma de realização preferida da invenção, estas células podem ser cepas diferentes de células CHO, tais como CHO K1 do tipo selvagem, CHO dhfr (Dux1) ou CHO dhfr (DG44), mas também células HEK, células Sp2/0. Estas células são tipicamente transfectadas com uma ou mais construções de DNA que codificam o(s) polipeptídeo(s) de interesse. Qualquer polipeptídeo que pode ser expressado nestas células hospedeiras pode ser produzido de acordo com a presente invenção.

Outra classe de células que pode ser usada com os meios de cultura de células de acordo com a presente invenção inclui células de hibridoma que são usadas comumente para a produção de anticorpos monoclonais ou policlonais.

Os polipeptídeos que podem ser produzidos a partir das culturas de células e os meios de cultura de

células de acordo com a presente invenção não são limitados. Os polipeptídeos podem ser recombinantes ou não recombinantes. O termo "polipeptídeo", como aqui utilizado, engloba moléculas constituídas de uma cadeia de mais do que dois aminoácidos unidos por ligações peptídicas; moléculas que contêm duas ou mais dessas cadeias; moléculas que compreendem uma ou mais dessas cadeias sendo adicionalmente modificadas, e.g. por glicosilação. O termo "polipeptídeo" é intencionado para englobar proteínas.

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

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento inteiro), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos), nanoanticorpos, anticorpos modificados, subunidades de anticorpos, derivados de anticorpos, anticorpos artificiais, combinações de anticorpos com proteínas e fragmentos de anticorpos suficientemente longos para apresentar a atividade biológica desejada. Os anticorpos monoclonais, como aqui usados, podem ser anticorpos humanos.

Entretanto, polipeptídeos que não anticorpos também podem ser produzidos usando culturas de células e os

meios de cultura de células de acordo com a presente invenção, e.g. polipeptídeos tais como proteínas transmembranares, receptores, hormonas, fatores de crescimento, proteases, proteínas coaguladoras e anticoaguladoras, proteínas inibidoras, interleucinas, fatores de transporte proteínas de fusão e similares.

Os produtos obtidos a partir desses processos de cultura de células podem ser usados para a preparação de preparações farmacêuticas. O termo "preparação farmacêutica" indica uma composição apropriada ou adaptada para administração a um mamífero, especialmente um ser humano.

Além disso, as proteínas de acordo com a invenção podem ser administradas junto com outros componentes de agentes biologicamente ativos tais como surfactantes, receptores, carreadores, diluentes e veículos farmacêuticamente aceitáveis.

A Tabela 1 resume composições de meios comercialmente disponíveis e meios de cultura de células adicionais das técnicas anteriores: os valores se baseiam em valores publicados; adições tais como NaOH não estão assim incluídas nos valores. A concentração de sódio ou a razão de sódio para potássio é assim bastante subestimada e, além disso, à parte dos valores da presente invenção.

Tabela 1

Meios	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Razão Na/K	Cl (mM)	Iões Totais (mM)	AA Totais (mM)	Razão Iões/AA
Meios Comerciais								
DMEM/F12	123	120,6	4,2	29	129,1	290	7,0	41,4
Ham's F12	147,0	130,1	3,0	49	135,0	305	4,0	76,2
MEM alfa	145,4	117,2	5,3	27	127,0	310,2	9,0	34,5
PRMI 1640	138,7	103,4	5,3	26	109,0	283,6	6,6	42,9
BME	144,4	117,2	5,3	27	126,4	307,1	1,4	219
Fischer	152,3	136,8	5,3	28	144,9	317	5,6	56,6
Outros Meios								
US 7294484	48/125/86	19/95/64	4,2	12/30/21	Não deter- minado (ND)	ND	> 70	ND
WO 02/101019	10,9/8,1	20,2/19,9	20,2/19,9	0,5/0,4	48/31	122,8/78,9	78,1/59,5	1,6/1,3
Meios A/B								

A Tabela 2 descreve formulações de meios de cultura de células de acordo com a presente invenção distinguidas por sua baixa razão de íões sódio para potássio.

Tabela 2

Meios	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Razão Na/K	Cl (mM)	Íões Totais (mM)	AA Totais (mM)	Razão Íões/AA
Meio 1	83,6	14,6	10,7	7,8	36,2	195,7	51,1	3,8
Meio 2	69,5	8,6	10,7	6,5	45,5	191,2	90,5	2,1
Meio 3	79,7	8,6	10,7	7,4	41,4	190,6	90,7	2,1
Meio 4	73,4	8,6	10,7	6,9	39,9	177,5	80,2	2,2
Meio 54	67,2	8,6	10,7	6,3	38,3	164,3	69,7	2,4
Meio 6	60,9	8,6	10,7	5,7	36,8	151,1	59,2	2,6

A Tabela 3 descreve as composições dos exemplos para meios de cultura de células quimicamente definidos de acordo com a presente invenção. Os componentes individuais destes meios de cultura de células estão disponíveis em fornecedores comerciais usuais.

Tabela 3

Componentes	Meio 1 Conc. Final (mg/L)	Meio 2 Conc. Final (mg/L)	Meio 3 Conc. Final (mg/L)	Meio 4 Conc. Final (mg/L)	Meio 5 Conc. Final (mg/L)	Meio 6 Conc. Final (mg/L)
CaCl ₂ anidro	131	133,2	130,6	130,6	130,6	130,6
KCl anidro	800	800	800	800	800	800
MgCl ₂ anidro	155	250,4	250,2	226,4	202,6	178,9
NaCl	850,6	500	500	500	500	500

(continuação)

Componentes	Meio 1 Conc. Final (mg/L)	Meio 2 Conc. Final (mg/L)	Meio 3 Conc. Final (mg/L)	Meio 4 Conc. Final (mg/L)	Meio 5 Conc. Final (mg/L)	Meio 6 Conc. Final (mg/L)
Fosfato ácido dissódico anidro	710	1065	1775	1508,8	1242,5	976,2
Bicarbonato de sódio anidro	2500	2000	2000	2000	2000	2000
L-Argina base livre	871	871	-	-	-	-
L-Arginina x HCl	-	-	1053	1053	1053	1053
L-Asparagina, H ₂ O	616	1501	1501	1.279,8	1.058,5	837,3
Ácido L-Aspártico	461	461	461	461	461	461
L-Cisteína	200,1	304,5	304,5	228,4	152,3	76,1
Sal de Na do ácido L-Glutâmico hidratado	-	182	-	-	-	-
Ácido L-Glutâmico	-	-	182	136,5	91	45,5
L-Histidina, HCl-H ₂ O	168	268	268	243	218	193
L-Isoleucina	394	894	894	769	644	519
L-Leucina	499	1199	1199	1025	850	675
L-Lisina, HCl	621	821	821	772	722	672
L-Metionina	179	279	279	255	230	205
L-Fenilalanina	264	464	464	414	364	314
L-Prolina	368	968	968	818	668	518
L-Serina	432	1.232	1.232	1.032	832	632
L-Treonina	333	533	533	484	434	384
L-Triptofano	102	252	252	214,5	177	139,5
L-Valina	375	775	775	676	576	476
L-Tirosina	277,7	422,5	422,5	316,9	211,3	105,6
Glicina	38	38	38	38	38	38
L-Glutamina	1169,2	1169,2	1169,2	1169,2	1169,2	1169,2
Biotina	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
D-Pantotenato de Ca	4	4	4	4	4	4
Ácido fólico	5	5	5	5	5	5
Mio-Inositol	40	140	140	115	90	65

(continuação)

Componentes	Meio 1 Conc. Final (mg/L)	Meio 2 Conc. Final (mg/L)	Meio 3 Conc. Final (mg/L)	Meio 4 Conc. Final (mg/L)	Meio 5 Conc. Final (mg/L)	Meio 6 Conc. Final (mg/L)
Nicotinamida	4	4	4	4	4	4
Piridoxina, HCl	2	2	2	2	2	2
Riboflavina	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Vitamina B12	2	2	2	2	2	2
Tiamina, HCl	4	4	4	4	4	4
Putrescina, 2 HCl	10	110	110	85	60	35
Cloreto de colina	40	240	240	190	140	90
Selenito de sódio (Na ₂ SeO ₃)	0,03	0,03	-	-	-	-
Selenito de sódio hepta- hidratado (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O)	-	-	0,02	0,02	0,02	0,02
Cloreto de Manganês tetra-hidratado	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Molibdato de amônio tetra-hidratado	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cloreto de zinco anidro	3	3	3	3	3	3
Cloreto cúprico di- hidratado	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cloreto de cobalto hexaidratado	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Etanolamina	10	100	100	77,5	55	32,5
Monotioglicerol	2	-	-	-	-	-
HEPES, forma ácida	17.870	4.766	4.766	3.574,5	2.383	1.191,5
Citrato triassósico di- hidratado	911,7	1.235,2	911,2	911,2	911,2	911,2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	54,1	54,1	54,1	54,1	54,1	54,1
Pluronic F68	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
D-Glicose anidra	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
HCl	-	327,6	-	-	-	-
NaOH	799,2	339,9	519,9	419,9	319,9	220

Tabela 4

Componentes	Meio de Alimentação (g/L)
NaOH 32%	18,7 mL
L-Tirosina	10,06
Cisteína	7,25

A Tabela 5 abaixo indica a composição de um meio de alimentação concentrado exemplificativo. O meio de alimentação pode ser adicionado baseado no consumo medido dos respectivos aminoácidos, ou de acordo com um programa fixo a e.g. 2% em peso por dia.

Tabela 5

Componentes	Meio de Alimentação (g/L)
L-Arginina, base livre	2,72
L-Histidina, HCl-H ₂ O	1,44
L-Isoleucine	3,44
L-leucina	5,20
L-Lisina, HCl	3,72
L-Metionina	1,08
L-Fenilalanina	1,72
L-Prolina	2,44
L-Serina	4,76
L-Treonina	2,08
L-Triptofano	0,88
L-Valina	3,16

(continuação)

Componentes	Meio de Alimentação (g/L)
L-Glutamina	29,23
D-Glicose mono-hidratada	275,0
25% de HCl	8,25 mL
32% de NaOH	5,6 mL

Para as experiências dos exemplos, uma linhagem de células CHO parental que é derivada da linhagem de células CHO-K1 dhfr (+), ATCC CCL-61 (Kao *et al.*, *Genetics* 55:513-524 (1967); Kao *et al.*, *PNAS* 60:1275-1281 (1968); Puck *et al.*, *J. Exp. Med.* 108:945-959 (1958)) por adaptação para condições do meio isento de proteína e isento de soro. Duas frações desta linhagem de células parental são transfectadas para expressar dois anticorpos monoclonais diferentes, mAB1 e mAB2, respectivamente.

Exemplo 1

No Exemplo 1, duas culturas em frascos com agitação, contendo o meio 1, são inoculados em paralelo com um clone de CHO produtor de mAb1. As culturas em frascos com agitação são incubadas em uma incubadora com dióxido de carbono a 37°C. No dia 3, um frasco agitador é transferido para uma incubadora com dióxido de carbono a 33°C. Ambos frascos com agitação são alimentados similarmente com duas soluções de alimentação. A alimentação foi suplementada de acordo com um programa fixo, com a adição de 0,4% em peso

da primeira solução de alimentação (Tabela 2) e 2% da segunda alimentação (Tabela 3) por dia começando no Dia 5 e durando até o final da cultura.

O deslocamento de temperatura para 33°C permite manutenção mais longa da densidade de células viáveis e viabilidade da cultura com o tempo (figuras 1 e 2), e o consequimento de um título mais alto do produto (figura 3) em comparação com a cultura que é mantida a 37°C para a duração total da experiência. Este exemplo ilustra o benefício de implementar um deslocamento de temperatura para 33°C durante um processo de produção em cultura de células baseado em uma linhagem de células CHO.

Exemplo 2

Neste exemplo, um biorreator de 300 L contendo o meio 2 é inoculado com um clone de CHO produtor de mAb2. No Dia 5, a temperatura do biorreator é deslocada de 36,5°C para 33°C. O ponto de ajuste do pH é 6,90 e a banda morta é 0,10. Como resultado, a cultura começa em pH 7,00 o pH se desloca para 6,80 entre o Dia 2 e o dia 4, e depois retorna progressivamente para 7,00 devido ao consumo de ácido láctico pelas células (figura 4). O deslocamento para pH 6,80 permite reduzir a adição de base em comparação com um cenário com um pH constante de 7,00. O retorno para pH 7,00 permite reduzir a concentração de CO₂ no meio em comparação com um cenário no qual o pH é deixado em 6,80 depois do primeiro deslocamento. Neste processo que combina desloca-

mentos de temperatura e pH, uma alta densidade de células viáveis é atingida e o decréscimo na densidade de células viáveis no decorrer do tempo é minimizado (figura 5), permitindo atingir no Dia 14 um título alto (figura 6) do produto com a qualidade adequada. A alimentação é aplicada similarmente à alimentação no Exemplo 1.

Lisboa, 15 de abril de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um meio de cultura de células, isento de soro, para desenvolver células de mamíferos, que é **caracterizado por** uma razão molar de iões de sódio para potássio entre 10 para 1 e 1 para 1.

2. O meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 1, em que o meio é um meio isento de proteína.

3. O meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a razão molar de iões de sódio para potássio está entre 8 para 1 e 6 para 1.

4. O meio de cultura, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração de iões de sódio está entre 50 e 90 mM.

5. O meio de cultura, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração de iões de potássio está entre 8 e 12 mM.

6. O meio de cultura, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração total de aminoácidos está entre 40 e 100 mM.

7. O meio de cultura, de acordo com qualquer

uma das reivindicações precedentes, em que a razão molar da concentração total de iões para a concentração total de aminoácidos está entre 1,9 e 4.

8. Um processo para a produção de um polipeptídeo recombinante, compreendendo cultivar células de mamíferos em um meio como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e expressar o polipeptídeo recombinante.

9. O processo, de acordo com a reivindicação 8, em que as condições da cultura compreendem pelo menos um deslocamento de temperatura e/ou pelo menos um deslocamento de pH.

10. O processo, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que a cultura é feita por um processo de alimentação descontínua.

11. O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, em que os polipeptídeos produzidos são glicosilados.

12. O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, em que o polipeptídeo é um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

13. O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, em que as células de mamíferos são

selecionadas a partir do grupo que consiste em células CHO, células HEK e células SP2/0.

14. O processo para a produção de um meio de cultura de células de acordo com a reivindicação 1, em que os diferentes componentes são misturados uns com os outros.

15. O processo, de acordo com a reivindicação 14, em que o cloreto de sódio é adicionado numa concentração entre 7 e 15 mM.

16. O processo, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que o cloreto de potássio é adicionado numa concentração entre 8 e 12 mM.

Lisboa, 15 de abril de 2015

Fig. 1

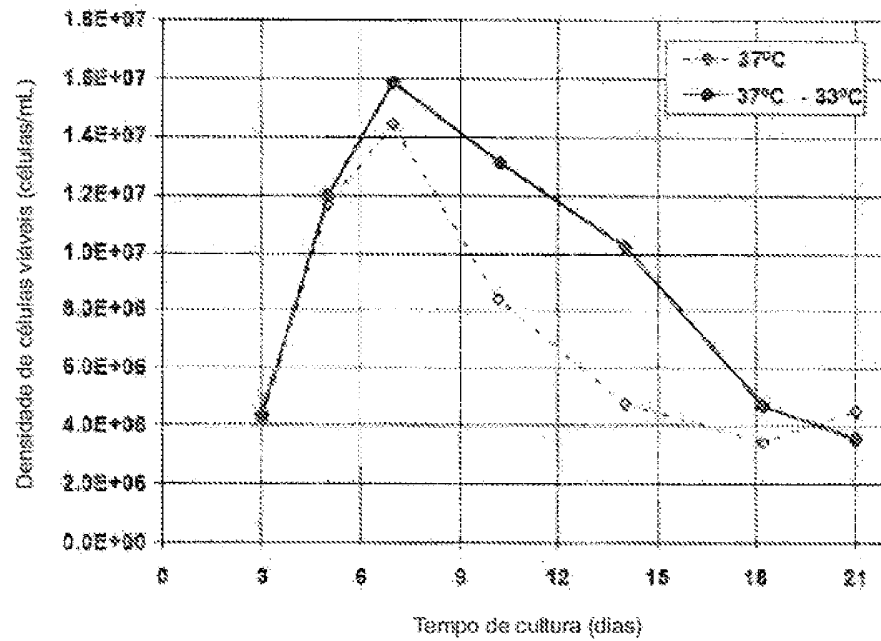


Fig. 2

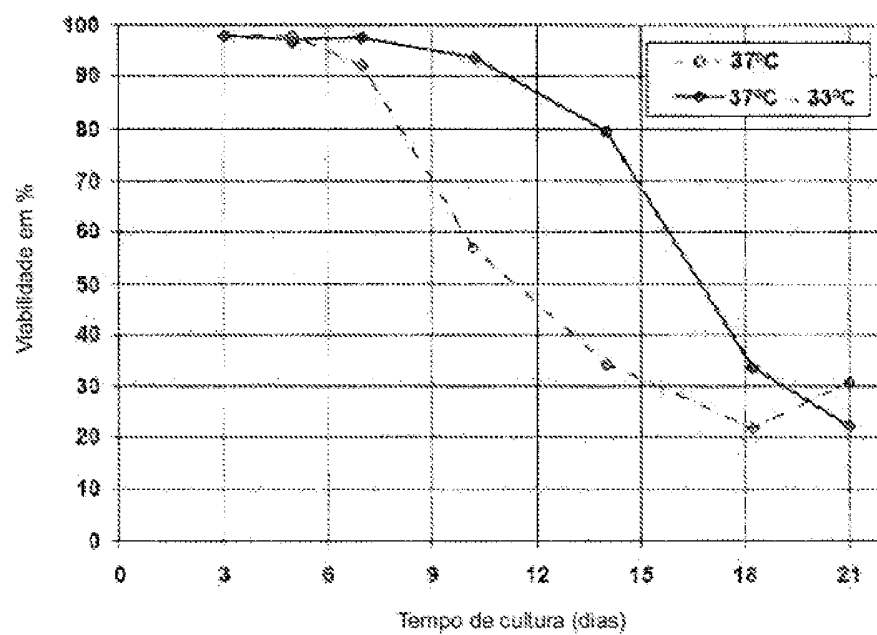


Fig. 3

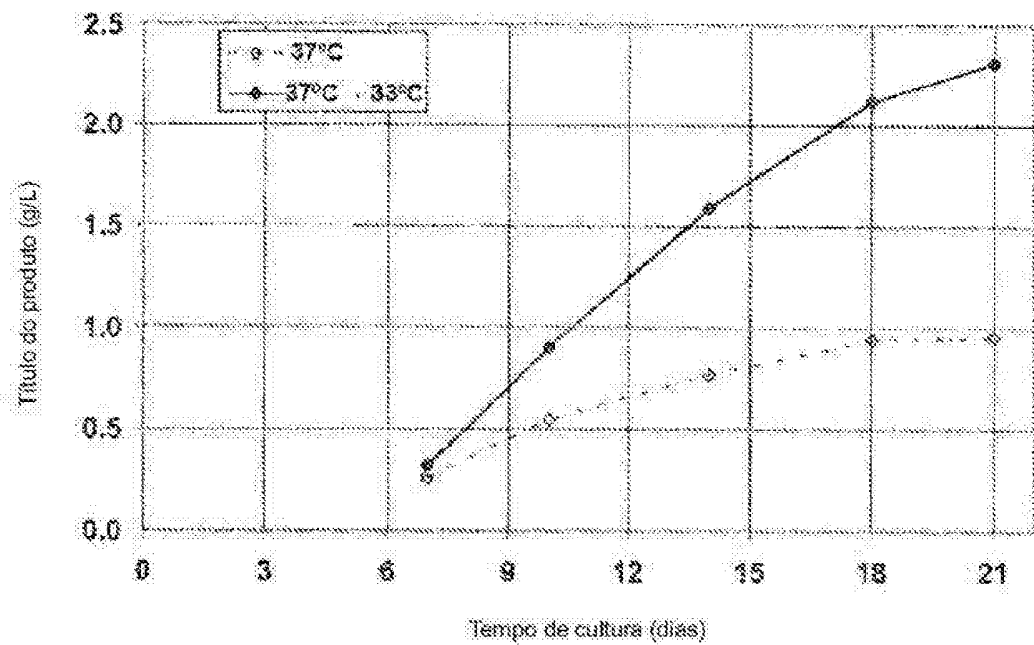


Fig. 4

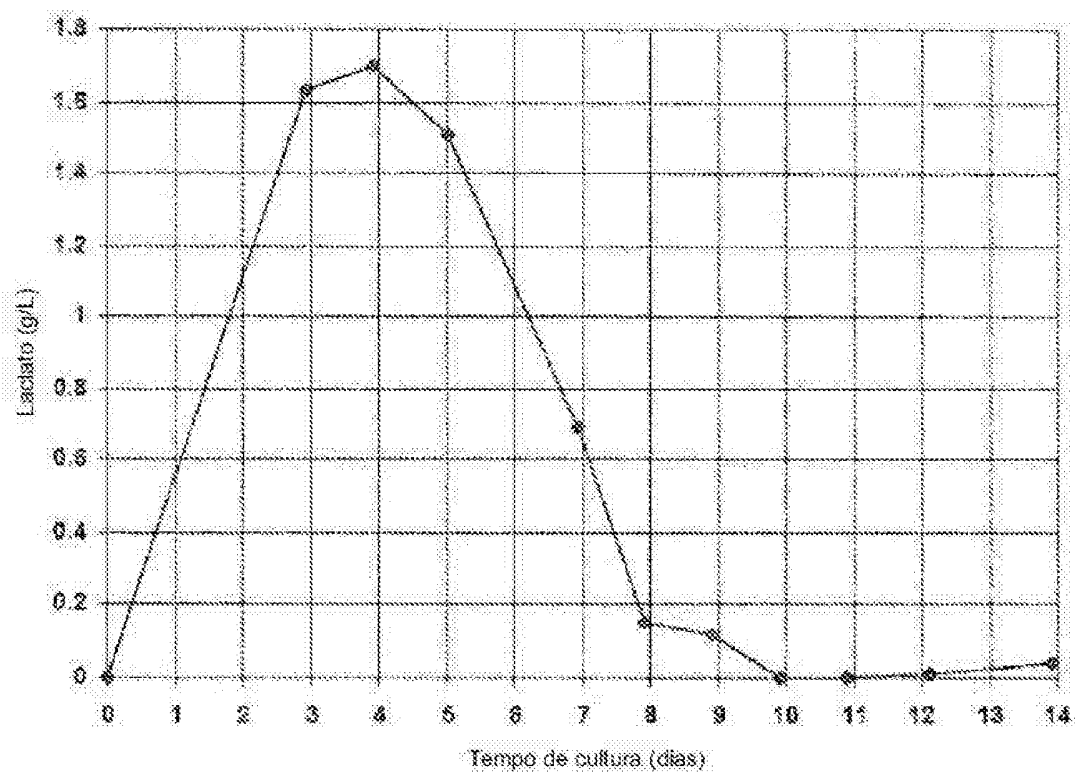


Fig. 5

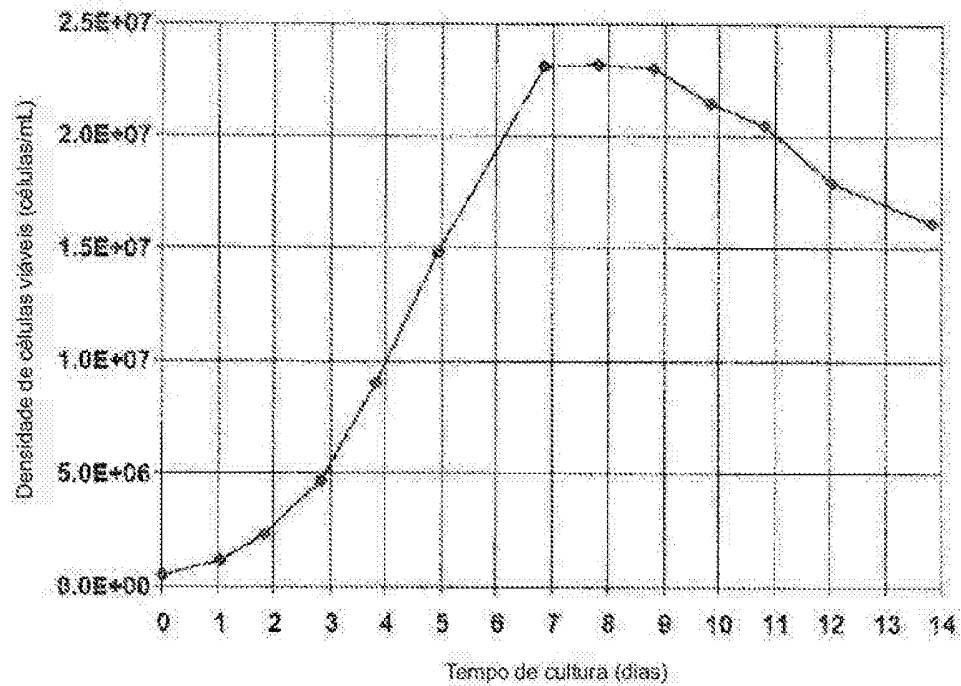
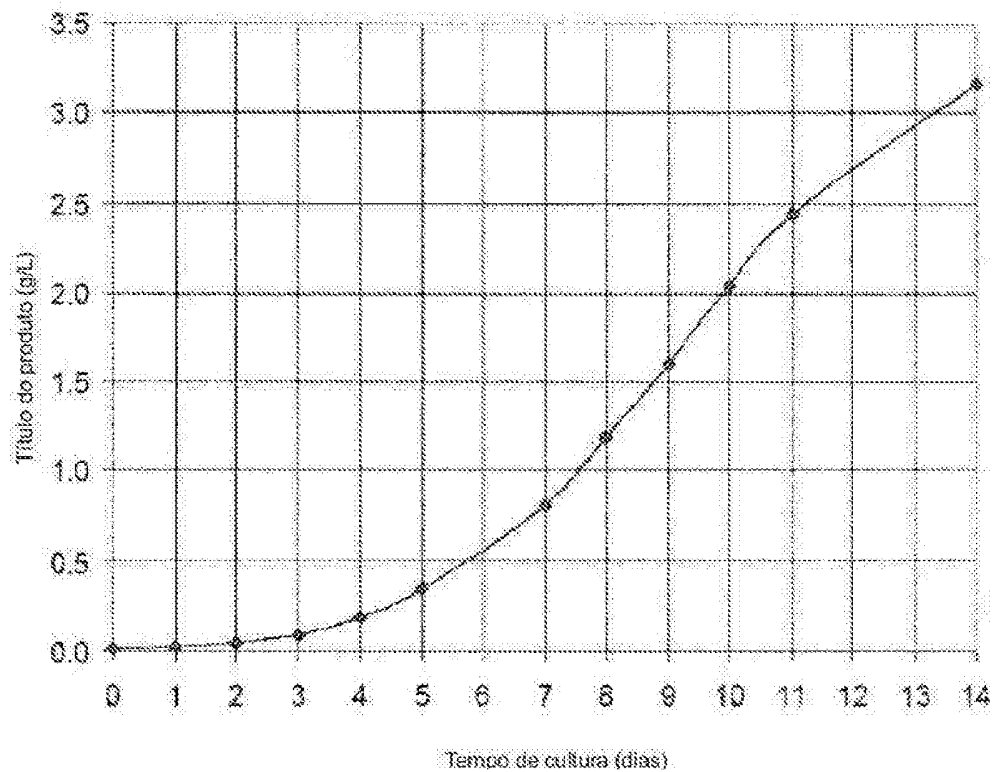


Fig. 6



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 5122469 A | * US 5830761 A |
| * EP 0481791 A | * US 7294484 B |
| * EP 0283942 A | * US 5135866 A |
| * WO 02066603 A | * US 5232848 A |
| * EP 0872487 A | * EP 0389786 A |
| * EP 1360314 A2 | * US 20080261259 A |
| * US 6838284 B | * US 6180401 B |
| * EP 1543106 A | * WO 02101019 A |
| * EP 0501435 A | |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|---|---|
| * KAPLAN. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. <i>Annu Rev Physiol</i> , 1978, vol. 40, 19-41 | * KAO. <i>Genetics</i> , 1967, vol. 55, 513-524 |
| | * KAO. <i>PNAS</i> , 1968, vol. 60, 1275-1281 |
| | * PUCK. <i>J. Exp. Med.</i> , 1958, vol. 108, 945-959 |