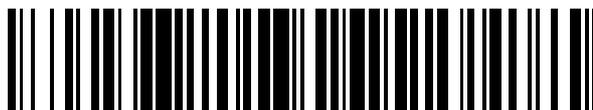


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 470**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12777325 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2702164**

54 Título: **Un método para reducir la heterogeneidad de anticuerpos y un proceso de producción de dichos anticuerpos**

30 Prioridad:

**29.04.2011 IN CH14832011**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.02.2016**

73 Titular/es:

**BIOCON RESEARCH LIMITED (100.0%)  
SEZ Unit No 3, Biocon Special Economic Zone,  
Bommasandra Jigani Link Road, Bommasandra  
Industrial Area  
Bangalore, Karnataka 560 099, IN**

72 Inventor/es:

**SRIVASTAVA, RUCHIKA;  
HEMDEV, SNEHA LAKSHMANDAS;  
BHATNAGAR, ANKUR;  
DESAN, SARAVANAN;  
GOEL, ANUJ y  
IYER, HARISH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 560 470 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Un método para reducir la heterogeneidad de anticuerpos y un proceso de producción de dichos anticuerpos

### 5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a métodos de mejora de la producción de proteínas, por ejemplo, producción de proteínas comerciales a gran escala, tal como producción de anticuerpos, utilizando un método de cultivo celular modificado que comprende una fase de crecimiento celular y una fase de producción de polipéptidos. El método de cultivo celular modificado controla los atributos y parámetros operativos del proceso para conseguir productos polipeptídicos que tienen variantes de carga alterada/variantes básicas. La presente divulgación se refiere a reducir la heterogeneidad en anticuerpos. Más específicamente, la divulgación comprende un método de cultivar células en un sistema de cultivo celular que reduce la heterogeneidad entre variantes de carga disminuyendo la proporción de variantes básicas.

### 15 **Antecedentes y técnica anterior de la divulgación**

Una gran proporción de productos de biotecnología, ya estén disponibles en el mercado o en desarrollo, son agentes terapéuticos proteicos. Existe, por lo tanto, una gran y creciente demanda de producción de proteínas en cultivos celulares, por ejemplo, en cultivos celulares animales, y de métodos mejorados relacionados con dicha producción. Por lo tanto, una cantidad significativa de investigación se centra en condiciones y métodos de cultivo de células animales que puedan optimizar el rendimiento polipeptídico, es decir, condiciones y métodos que soportan densidad celular elevada y un elevado valor cuantitativo de proteínas.

La variación de lisina C-terminal se observa habitualmente en anticuerpos monoclonales biofarmacéuticos. La heterogeneidad del anticuerpo monoclonal puede atribuirse a diversos factores tales como modificaciones amino-terminales (por ejemplo, a piroglutamato), procesamiento incompleto del extremo C, desamidación de asparagina, fosforilación, glucosilación, oxidación, mutaciones etc. Estos tipos de variaciones se producen en muchos tipos de proteínas y pueden afectar a su actividad y estabilidad en bioterapéutica. La homogeneidad de los anticuerpos es un importante atributo y se considera esencial para demostrar la seguridad y la eficacia de fármacos, tal como lo requiere la FDA y otras agencias reguladoras.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes han demostrado tener heterogeneidad C-terminal con una arginina (Arg) o lisina (Lys) en el extremo C. Cuando estas variantes C-terminales de MAb son tratadas con carboxipeptidasa B, una exopeptidasa, Arg y Lys son escindidas del extremo C de ambas subunidades del anticuerpo, eliminando la heterogeneidad C-terminal.

Las carboxipeptidasas (CP) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico C-terminal en péptidos y proteínas. La eliminación de uno o unos pocos aminoácidos del extremo C de un péptido o proteína puede tener profundos efectos sobre la actividad biológica de esa molécula. La heterogeneidad de MAb es habitual debido a las diversas modificaciones introducidas durante el periodo de vida de las moléculas desde el punto de síntesis hasta el punto de aclaramiento completo del sujeto. Es importante estudiar las modificaciones de un agente terapéutico, dado que existe una posibilidad de que éste afecte a la actividad/seguridad de la preparación, causando pérdida de eficacia y riesgo de efectos secundarios adversos.

La patente de Estados Unidos n.º 5.126.250 desvela un método de reducción de la heterogeneidad de anticuerpos secretados a partir de células productoras de anticuerpos.

El documento WO 2011/039150 enseña la eliminación de heterogeneidad causada por residuos de lisina C-terminales incubando anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular, posteriormente a éste con carboxipeptidasa B.

### 50 **Exposición de la divulgación**

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método de reducción de la heterogeneidad en anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular, dicho método comprende añadir iones metálicos de transición divalentes al medio de cultivo de producción de anticuerpos o alterando la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos, para obtener dichos anticuerpos con heterogeneidad reducida; y un proceso para producir un anticuerpo que tiene heterogeneidad reducida, comprendiendo dicho proceso acciones de: (a) cultivar células en medio de cultivo para producir el anticuerpo, y añadir iones metálicos de transición divalentes al medio de cultivo o alterar la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos, y (b) recuperar el anticuerpo del medio de cultivo que tiene la heterogeneidad reducida.

### 65 **Breve descripción de las figuras adjuntas**

Para que la divulgación se pueda entender y llevar a efecto práctico fácilmente, a continuación se hará referencia a realizaciones ejemplares, tal como se ilustran con referencia a los dibujos adjuntos. Las figuras, junto con una

descripción detallada a continuación, se incorporan en y forman parte de la memoria descriptiva, y sirven para ilustrar adicionalmente las realizaciones y explicar diversos principios y ventajas, de acuerdo con la presente divulgación, donde:

- 5        **La figura 1** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 264 h, es decir el día 11 (Anticuerpo 1).  
**La figura 2a** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
**La figura 2b** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de magnesio a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
10        **La figura 3** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en el medio de baja osmolalidad (240-260 mOsm/kg) con iones de zinc y medio de producción de osmolalidad de 310-320 mOsm/kg a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
**La figura 4** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 15        168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 2).  
**La figura 5** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en el medio de baja osmolalidad (240-260 mOsm/kg) con iones de zinc y medio de producción del intervalo de osmolalidad (310-320 mOsm/kg) (Anticuerpo 3).  
**La figura 6** muestra la diferencia en el % de variantes básicas totales con diferente osmolalidad inicial del medio. (Anticuerpo 1)  
20        **La figura 7** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc (1 mM) a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
**La figura 8** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc (0,5 mM) a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
25        **La figura 9** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 3).  
La figura 10 muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 4).  
**La figura 11** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 30        168 h, es decir el día 7 (Anticuerpo 1).  
**La figura 12** muestra la diferencia en el % de variantes básicas en presencia y ausencia de iones de zinc a las 192 h, es decir el día 8 (Anticuerpo 3).

**NOTA:** en el control no se han alimentado iones de zinc.

### Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un método de reducción de la heterogeneidad en anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular, dicho método comprende el acto de añadir iones metálicos al medio de cultivo de producción de anticuerpos o alterar la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos para obtener dichos anticuerpos con heterogeneidad reducida.

En una realización de la presente divulgación, la heterogeneidad se debe a la proporción de variante de carga del anticuerpo; y en la que la reducción de la heterogeneidad se lleva a cabo reduciendo la proporción de resto de lisina en el extremo C del anticuerpo.

En otra realización de la presente divulgación, la heterogeneidad se reduce llevando a cabo dicho método para una proporción de anticuerpos que varía entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 %.

En aún otra realización de la presente divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo de origen natural o un anticuerpo recombinante seleccionado entre un grupo que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo modificado, un derivado de anticuerpo y un fragmento de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más de la presente divulgación, la heterogeneidad se reduce disminuyendo la proporción de variantes básicas del anticuerpo entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 30 % e incrementando el pico principal/0 lisina entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 25 %.

En otra realización más de la presente divulgación, el ion metálico de transición divalente es  $Zn^{+2}$ , a una concentración que varía entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 1,5 mM

En otra realización más de la presente divulgación, la osmolalidad del medio de cultivo está alterada para proporcionar una osmolalidad que varía entre aproximadamente 240 mOsm/kg y aproximadamente 260 mOsm/kg.

En otra realización más de la presente divulgación, el cultivo es "cultivo semicontinuo" (fedbatch); y comprende cultivo de células de mamífero, preferentemente cultivo de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

En otra realización más de la presente divulgación, la adición de iones metálicos se lleva a cabo en primer lugar durante la fase de crecimiento celular y en segundo lugar durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular; o en la que la adición del ion metálico se lleva a cabo en una fase inicial antes de dicho cultivo de las células.

5 La presente divulgación se refiere, además, a un proceso para producir un anticuerpo que tiene heterogeneidad reducida, comprendiendo dicho proceso acciones de: (a) cultivar células en medio de cultivo para producir el anticuerpo, y añadir iones metálicos de transición divalentes al medio de cultivo o alterar la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos, y (b) recuperar el anticuerpo del medio de cultivo que tiene la heterogeneidad reducida.

10 En una realización de la presente divulgación, las células se cultivan a una concentración que varía entre aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células/ml.

15 En otra realización de la presente divulgación, el cultivo se lleva a cabo a temperaturas que varían entre aproximadamente  $36\text{ }^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $38\text{ }^\circ\text{C}$ .

20 En aún otra realización de la presente divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo de origen natural o un anticuerpo recombinante seleccionado entre un grupo que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo modificado, un derivado de anticuerpo y un fragmento de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más de la presente divulgación, la heterogeneidad se debe a la proporción de variante de carga del anticuerpo; y en la que la reducción de la heterogeneidad se lleva a cabo reduciendo la proporción de resto de lisina en el extremo C del anticuerpo.

25 En otra realización más de la presente divulgación, la heterogeneidad se reduce llevando a cabo dicho método para una proporción de anticuerpos que varía entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 %.

30 En otra realización más de la presente divulgación, la heterogeneidad se reduce disminuyendo la proporción de variantes básicas del anticuerpo entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 30 % e incrementando el pico principal/0 lisina entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 25 %.

En otra realización más de la presente divulgación, el cultivo es "cultivo semicontinuo" (fedbatch); y comprende cultivo de células de mamífero, preferentemente cultivo de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

35 En otra realización más de la presente divulgación, el ion metálico es  $\text{Zn}^{+2}$ , a una concentración que varía entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 1,5 mM.

40 En otra realización más de la presente divulgación, la osmolalidad del medio de cultivo está alterada para proporcionar una osmolalidad que varía entre aproximadamente 240 mOsm/kg y aproximadamente 260 mOsm/kg.

45 En otra realización más de la presente divulgación, la adición del ion metálico se lleva a cabo en primer lugar durante la fase de crecimiento celular y en segundo lugar durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo a temperaturas que varían entre aproximadamente  $30\text{ }^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $32\text{ }^\circ\text{C}$ , o en la que la adición del ion metálico se lleva a cabo en una fase inicial antes de dicho cultivo de las células.

50 En otra realización más de la presente divulgación, la fase de crecimiento celular tiene una concentración de células que varía entre aproximadamente  $12 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $13 \times 10^6$  células/ml, y en la que la fase de producción de polipéptidos tiene una concentración de células que varía entre aproximadamente  $13 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml.

En una realización de la presente divulgación, los iones de zinc divalentes se usan preferentemente en forma de sulfato de zinc heptahidratado. Otros compuestos de zinc pueden incluir, aunque sin limitarse a  $\text{ZnH}_2$ ,  $\text{Zn(OH)}_2$ ,  $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnCl}_2$ .

55 En una realización de la presente divulgación, la reducción de la heterogeneidad se lleva a cabo reduciendo la proporción de resto de lisina en el extremo C del anticuerpo sin el uso de una enzima para eliminar los residuos de lisina.

60 La presente divulgación supera las limitaciones de la técnica anterior para proporcionar un método para reducir la heterogeneidad de anticuerpos. Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar métodos para mejorar la producción de proteínas, por ejemplo, producción de proteínas comerciales a gran escala, por ejemplo, producción de anticuerpos, utilizando un método de cultivo celular modificado que comprende una fase de crecimiento celular y una fase de producción de polipéptidos.

65 En otro objetivo de la presente divulgación, la variante básica de los anticuerpos disminuye, mediante adición de iones metálicos como  $\text{Zinc}^{+2}$ .

En otro objetivo más de la divulgación, la concentración de iones de zinc está en el intervalo de 0,05-1,5 mM.

En otro objetivo más de la presente divulgación, las variantes básicas de los anticuerpos disminuyen rebajando la osmolalidad de los medios de producción.

5 Otro objetivo más de la presente divulgación comprende un método de cultivar células en un sistema de cultivo celular que disminuye la heterogeneidad entre variantes de carga incrementando la formación de pico principal/0 lisina, en el que hay esencialmente cero lisinas en el extremo C de cualesquiera cadenas del anticuerpo.

10 Otro objetivo más de la presente divulgación, la variante básica en el medio de cultivo celular disminuye un 3-30 %.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos de mejora de la producción de proteínas, por ejemplo, producción de proteínas comerciales a gran escala, por ejemplo, producción de anticuerpos, utilizando un método de cultivo celular modificado que comprende una fase de crecimiento celular y una fase de producción de polipéptidos.

Además, la divulgación expone reducir la microheterogeneidad en anticuerpos. Más específicamente, la divulgación comprende un método de cultivar células en un sistema de cultivo celular que disminuye la heterogeneidad entre variantes de carga disminuyendo la formación de variantes básicas.

20 La presente divulgación se refiere a un proceso para la producción de un anticuerpo monoclonal con una proporción alterada de variantes básicas cultivando células de mamífero y aislando el MAb del medio de cultivo y/o las células.

En una realización de la presente divulgación, las variantes básicas de los anticuerpos disminuyen, mediante adición de iones metálicos como Zinc<sup>+2</sup> en el intervalo de 0,05-1,5 mM y usando los medios de producción del intervalo de osmolalidad de 240-260 mOsm/kg.

Aún otra realización de la presente divulgación disminuye el % de variantes básicas de un anticuerpo que están asociadas normalmente con un procedimiento de producción estándar. Ventajosamente, la divulgación proporciona beneficios económicos y comerciales a través de la recuperación de la mayor cantidad del producto con calidad deseada, especialmente para anticuerpos biosimilares.

#### Definición de los términos

35 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos o derivados de anticuerpos o fragmentos de los mismos y las especificaciones de los anticuerpos también se aplican a la preparación de anticuerpos de la presente divulgación. Entre los fragmentos de anticuerpo, equivalentes funcionales u homólogos de anticuerpos se incluye cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina o péptidos que imitan este dominio de unión junto con una región Fc o una región homóloga a una región Fc o al menos parte de ésta. Están incluidas moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalentes, fusionadas a otro polipéptido.

Moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo aquellas partes conocidas como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y F(v), así como la estructura de N-glicano.

45 Anticuerpo describe un componente funcional del suero y a menudo se denomina como una colección de moléculas (anticuerpos o inmunoglobulinas, fragmentos, etc.) o como una molécula (la molécula de anticuerpo o molécula de inmunoglobulina). Una molécula de anticuerpo es capaz de unirse a o de reaccionar con un determinante antigénico específico (el antígeno o el epítipo antigénico) lo que, a su vez, puede causar la inducción de mecanismos efectores inmunológicos. Una molécula de anticuerpo individual se considera habitualmente monoespecífica, y una composición de moléculas de anticuerpo puede ser monoclonal (es decir, que consiste en moléculas de anticuerpo idénticas) o policlonal (es decir, que consiste en moléculas de anticuerpo diferentes que reaccionan con el mismo o diferentes epítopos en el mismo antígeno o en distintos antígenos diferentes). Las moléculas de anticuerpo distintas y diferentes que constituyen un anticuerpo policlonal pueden denominarse "miembros". Cada molécula de anticuerpo tiene una estructura única que le permite unirse específicamente a su antígeno correspondiente, y todas las moléculas de anticuerpo naturales tienen la misma estructura básica global de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

La heterogeneidad se define como un fenómeno en el que anticuerpos secretados tienen diversas formas bioquímicas discretas, tales como, aunque sin limitarse a, un aminoácido o aminoácidos extra en el extremo carboxi de una o ambas de las cadenas pesadas del anticuerpo o como una modificación en un aminoácido que causa diferencia en la distribución de carga global del anticuerpo.

65 Tal como se usan en el presente documento, las frases "polipéptido" o "producto polipeptídico" son sinónimos de los términos "proteína" y "producto proteico", respectivamente y, tal como se entiende generalmente en la técnica, se refieren a al menos una cadena de aminoácidos enlazados mediante enlaces peptídicos secuenciales. En ciertas

- realizaciones, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" o similar es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógena que ha sido transformada en una célula huésped. En ciertas realizaciones, en las que un ADN exógeno con el que ha sido transformada la célula huésped codifica la "proteína de interés", la secuencia de ácido nucleico del ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones, una
- 5 "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena a la célula huésped. En ciertas realizaciones, la expresión de dicha proteína de interés endógena esta alterada transfectando una célula huésped con una molécula de ácido nucleico exógena que puede, por ejemplo, contener una o más secuencias reguladoras y/o codificar una proteína que mejora la expresión de la proteína de interés.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, "variante de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental. Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Dichas variantes tienen necesariamente menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo parental. En una
- 15 realización preferida, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75 % a menos del 100 % de identidad o similitud de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente de aproximadamente el 80 % a menos del 100 %, más preferentemente de aproximadamente el 85 % a menos del 100 %, más preferentemente de aproximadamente el 90 % a menos del 100 %, y de la forma más preferente de
- 20 aproximadamente el 95 % a menos del 100 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir el mismo residuo) a los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir la identidad de secuencia porcentual máxima.
- 25 Los términos "medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren células animales en cultivo, por ejemplo, células de mamífero, y también pueden referirse a medio en combinación con células. (Normalmente, pueden usarse medios disponibles en el mercado tales como de medio de cultivo CDM4NS0 de Hyclone, CDM4Mab de Hyclone, CDOptiCHO de Invitrogen y CHO de Lonza Power).
- 30 Los huéspedes de mamífero preferidos son células CHO y el modo de fermentación preferido es el "semicontinuo" (fedbatch). Son ejemplos de otras líneas celulares NS0 (No Secretoras) y BHK (riñón de cría de hámster).
- Métodos y vectores para manipular genéticamente células y/o líneas celulares para expresar una proteína de interés son bien conocidas por los expertos en la materia. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, aunque no se
- 35 limitan a, vectores de expresión, recombinación homóloga y activación génica dirigidas. Opcionalmente, las proteínas se expresan bajo el control de un elemento de control heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor que en la naturaleza no dirige la producción de ese polipéptido. Por ejemplo, el promotor puede ser un potente promotor viral (por ejemplo, CMV, SV40) que dirige la expresión de un polipéptido de mamífero. La célula huésped puede o no producir normalmente la proteína. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula CHO que ha sido manipulada genéticamente para producir una proteína, lo que significa que el ácido nucleico que codifica la proteína ha sido
- 40 introducido en la célula CHO.
- Un experto en la materia reconocerá a qué temperatura y/o concentración debe cultivarse una línea celular particular. Por ejemplo, la mayoría de las células de mamífero, por ejemplo, células CHO, crecen bien dentro del
- 45 intervalo de aproximadamente 35° C a 39° C, preferentemente a 37° C, mientras que las células de insecto se cultivan normalmente a 27° C.
- En una realización de la divulgación, la proteína producida usando el método de la divulgación es un anticuerpo o un
- 50 fragmento de unión al antígeno del mismo. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno y normalmente dos, dominios VH o partes de los mismos, y/o al menos uno, y normalmente dos, dominios VL o partes de los mismos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están interconectadas mediante, por ejemplo, puentes disulfuro. Los
- 55 anticuerpos, o una parte de los mismos, pueden obtenerse a partir de cualquier origen, incluyendo aunque sin limitarse a, roedor, primate (por ejemplo, primate humano y no humano), tiburón, etc., o pueden producirse de forma recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados, y/o generados in vitro, por ejemplo, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia.
- 60 En la realización preferida, el cultivo celular de la presente divulgación se realiza en un matraz oscilante (30 ml de volumen de trabajo) y/o un biorreactor (1 l/50 l) y se emplea modo "semicontinuo" (fedbatch). En los cultivos "semicontinuos" (fedbatch), las células huésped de mamífero y medio de cultivo con una osmolalidad de 300-310 mOsm/kg se suministran inicialmente y los nutrientes (aminoácidos, glucosa y vitaminas) son alimentados periódicamente. La serie de fermentación de producción comienza con un recuento celular inicial de 0,5-0,6x10<sup>6</sup>
- 65 células/ml a 37 ± 1 °C, los 3-4 primeros días se dedican al crecimiento de las células. La siguiente etapa implica rebajar la temperatura a 31± 1 °C grados y la adición de iones de zinc de forma intermitente dos veces, de modo que

la cantidad total de adición llega a 0,05-1,5 mM (una dosis durante la fase de crecimiento-3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> día y la otra dosis durante la fase de producción-6<sup>o</sup>/7<sup>o</sup>/8<sup>o</sup> día). La preparación de anticuerpos siguiendo las realizaciones de la presente divulgación preferentemente al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %, de la forma más preferente el 100 % de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos carecen de un resto de lisina C-terminal, en particular determinado en la suma de las cadenas pesadas (que normalmente pueden comprender lisina). Dado que los anticuerpos pueden tener más cadenas que potencialmente comprenden la lisina C-terminal, se entiende que el porcentaje cuantitativo de la falta de lisina se refiere a todas las cadenas que potencialmente tienen la lisina C-terminal. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales son heterogéneos en cuanto a presencia de la lisina C-terminal.

En otra realización, el cultivo celular de la presente divulgación se realiza en un matraz oscilante (30 ml de volumen de trabajo) y/o un biorreactor (1 l/50 l), y se emplea modo "semicontinuo" (fedbatch). En los cultivos "semicontinuos" (fedbatch) preferidos, las células huésped de mamífero y el medio de cultivo con una osmolalidad reducida de 240-260 mOsm/kg se suministran inicialmente, y los nutrientes (aminoácidos, glucosa y vitaminas) son alimentados periódicamente. La osmolalidad del medio se reduce diluyendo los medios con MilliQ/WFI. La serie de fermentación de producción comienza con un recuento celular inicial de 0,5-0,6x10<sup>6</sup> células/ml a 37 ± 1 °C, los 3-4 primeros días se dedican al crecimiento de las células. La siguiente etapa implica rebajar la temperatura a 31± 1 °C y la adición de iones de zinc a la concentración de 0,1 mM intermitentemente dos veces (una dosis durante la fase de crecimiento-3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> día y la otra dosis durante la fase de producción-5<sup>o</sup>/6<sup>o</sup>/7<sup>o</sup>/8<sup>o</sup> día). La preparación de anticuerpos siguiendo las realizaciones de la presente divulgación preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 99 %, de la forma más preferente 100 % de los anticuerpos modificados, derivados o fragmentos de los mismos carecen de un resto de lisina C-terminal, en particular determinado en la suma de las cadenas pesadas (que normalmente pueden comprender lisina). Dado que los anticuerpos pueden tener más cadenas que potencialmente comprenden la lisina C-terminal, se entiende que el porcentaje cuantitativo de la falta de lisina se refiere a todas las cadenas que potencialmente tienen la lisina C-terminal. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales son heterogéneos en cuanto a presencia de la lisina C-terminal.

Las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente divulgación se presentan para fines de ilustración y descripción. No pretenden ser exhaustivas o limitar la divulgación a las formas precisas desveladas. Diversas modificaciones y variaciones son posibles en vista de las anteriores enseñanzas. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición o materia, proceso, etapa o etapas del proceso particulares, al objetivo, espíritu y alcance de la presente divulgación. Todas dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas en el presente documento.

La tecnología de la presente solicitud está elaborada, además, con ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debe interpretarse que los ejemplos limitan el alcance de la divulgación.

**Ejemplos:**

La presente divulgación desvela la producción de anticuerpos con heterogeneidad reducida. El Anticuerpo-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). El Anticuerpo-2 es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor HER2/neu (Anticuerpo anti her 2). El Anticuerpo-3 es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe TNF y el Anticuerpo-4 es anti CD6.

**EJEMPLO 1:**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo-1

El medio de cultivo con osmolalidad de 300-310 mOsm/kg se suministró y se inoculó con células a una concentración de 0,5-0,6x10<sup>6</sup>/ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó 12-13x10<sup>6</sup>/ml el 4<sup>o</sup> día, la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C. La primera dosis de zinc se alimentó a una concentración de 0,1 mM. El 8<sup>o</sup> día, otra dosis de zinc se alimentó a una concentración de 0,1 mM y cuando el recuento celular era 13-15x10<sup>6</sup>/ml. Se le dejó proseguir hasta el 11<sup>o</sup> día. La heterogeneidad observada se tabula de la siguiente manera.

Tabla-1

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (día)
Control	Día 11 <sup>o</sup>	55	27,8	
Matraz alimentado con zn		60,9	24,1	4 <sup>o</sup> y 8 <sup>o</sup> día

La figura 1 ilustra los resultados anteriores.

**EJEMPLO 2:**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 1

5 El cultivo celular se realizó en un modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos “semicontinuos” (fedbatch) las células huésped de mamífero y el medio de cultivo se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. El medio de cultivo se inoculó con células a una concentración de  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (el 3º día), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y a continuación se alimentó la primera dosis de zinc a una concentración de 0,1 mM. Otra dosis se alimentó cuando el recuento celular alcanzaba  $13-15 \times 10^6$ /ml (el 6º día) a una concentración de 0,1 mM y se dejó proseguir el proceso en el matraz hasta el 7º día. En otro medio de cultivo, se alimentaron iones de magnesio que no mostraron ninguna diferencia respecto a variantes básicas y este ejemplo se ha proporcionado como control negativo. La heterogeneidad observada se tabula de la siguiente manera:

15

Tabla-2

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (día)
Control	Día 7º	56,2	35,4	
Matraz alimentado con zn		64,3	25,6	día 3º y día 6º
Matraz alimentado con Mg		46,1	38	

La figura 2 ilustra los resultados anteriores.

**EJEMPLO 3:**

Uso de medios de producción de baja osmolalidad con iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 1

20

El cultivo celular se realizó en un modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos, las células huésped de mamífero y el medio de cultivo de baja osmolalidad se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (el 3º día), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y a continuación una primera dosis de iones de zinc se alimentó a una concentración de 0,1 mM. Otra dosis se alimentó cuando el recuento celular alcanzaba  $13-15 \times 10^6$ /ml (el 6º día) a una concentración de 0,1 mM y se permitió proseguir la fermentación hasta el 7º día.

25

30 La osmolalidad observada se tabula de la siguiente manera

Tabla-3

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Intervalo de osmolalidad (mOsm/kg)	Alimentación de zn (día)
Osmolalidad elevada (Control)	Día 7º	50,9	30,2	300-360	
Baja osmolalidad con iones de zinc		55,8	24,8	230-270	Día 3º y 6º

La figura 3 ilustra los resultados anteriores.

**EJEMPLO 4:**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 2

35

El cultivo celular se realizó en modo “semicontinuo” (fedbatch). Los cultivos de las células huésped de mamífero y medio de cultivo (con baja osmolalidad) se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (el 3º día), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y a continuación se alimentó la primera dosis de zinc a una concentración de 0,1 mM. Se añadió otra dosis cuando el recuento celular alcanza  $13-15 \times 10^6$ /ml (el 6º día) a una concentración de 0,1 mM y se permitió proseguir la fermentación hasta el 7º día. La heterogeneidad observada se tabula de la siguiente manera

40

45

Tabla-4

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (día)
Control	Día 7º	49,4	29,1	Día 3º y 6º
Matraz alimentado con zn		55	23,6	
La figura 4 ilustra los resultados anteriores.				

**EJEMPLO 5:**

5 Uso de medios de producción de baja osmolalidad para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 3

10 El cultivo celular se realiza en un biorreactor a gran escala y se empleó modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos “semicontinuos” (fedbatch), las células huésped de mamífero y el medio de cultivo de baja osmolalidad se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. En este ensayo, el biorreactor se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (el 3º día), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y a continuación se alimentó la primera dosis de zinc a una concentración de 0,1 mM. Otra dosis se alimentó cuando el recuento celular alcanzaba  $13-15 \times 10^6$ /ml (el 5º día) a una concentración de 0,1 mM y se permitió proseguir la fermentación hasta el día 12º.

15 La osmolalidad observada se tabula de la siguiente manera

Tabla-5

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	Variante básicas (%)	Intervalo de osmolalidad (mOsm/kg)	Alimentación de zn (día)
Lote de control	Día 8º	47,8	36,2	300-370	
	Día 12º	36,2	43,2		
Lote de baja osmolalidad con iones de zinc	Día 8º	62,2	19,3	230-260	Día 3º y 5º
	Día 12º	58,8	17,3		
La figura 5 ilustra los resultados anteriores.					

20 **EJEMPLO 6:**

Uso de medios de producción de baja osmolalidad para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 1

25 El cultivo celular se realizó en un modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos “semicontinuos” (fedbatch), las células huésped de mamífero y el medio de cultivo de baja osmolalidad se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. Se usaron tres medios con niveles diferentes de osmolalidad inicial. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Al lote se le permitió seguir el proceso hasta el 7º día. Los medios de cultivo muestran que con la disminución de la osmolalidad del medio inicial, existe una  
30 disminución en el % global de variantes básicas. No se observó diferencia en el perfil de crecimiento de la línea celular. La disminución observada en variantes básicas con la disminución de la osmolalidad se tabula de la siguiente manera.

Tabla-6

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Osmolalidad inicial del medio
Ensayo de osmolalidad	Día 8º	41,1	24,4	305
		42,9	21,3	271
		45,2	20,5	256
La figura 6 ilustra los resultados anteriores.				

35 **EJEMPLO 7:**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 1

40 El cultivo celular se realizó en modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos “semicontinuos” (fedbatch) las células huésped de mamífero y el medio de cultivo se suministraron inicialmente (incluyendo iones de zinc 1 mM) y los

nutrientes se alimentaron periódicamente. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el cultivo celular alcanzaba  $12-13 \times 10^6$ /ml la temperatura se cambió de  $37^\circ\text{C}$  a  $31^\circ\text{C}$  y se dejó proseguir el proceso en el matraz hasta el 7º día. La reducción observada de heterogeneidad se tabula de la siguiente manera.

5

Tabla-7

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)
Control	Día 7º	50,6	32,3
iones de zinc 1 mM		57,9	22,1
La figura 7 ilustra los resultados anteriores.			

**EJEMPLO 8:**

10 Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo 1

El cultivo celular se realizó en un modo “semicontinuo” (fedbatch). El medio de cultivo con 0,5 mM de iones de Zinc se inoculó con  $0,5-0,6 \times 10^6$  células/ml y el cultivo se alimentó con nutrientes periódicamente. En el momento de alcanzar el recuento celular  $12-13 \times 10^6$ /ml, la temperatura se cambió a  $31^\circ\text{C}$  y se permitió proseguir a la fermentación hasta el 7º día. La reducción observada de heterogeneidad se tabula de la siguiente manera.

15

Tabla-8

Ensayo	Día de cultivo	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)
Control	7º	46	30,4
iones de zinc 0,5 mM		50,5	26,3
La figura 8 ilustra los resultados anteriores.			

**EJEMPLO 9**

20

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo-3

El cultivo celular se realizó empleando modo “semicontinuo” (fedbatch). El medio de cultivo se inoculó con  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. En el momento de alcanzar el recuento celular de  $12-13 \times 10^6$ /ml la temperatura se cambió de  $37^\circ\text{C}$  a  $31^\circ\text{C}$  y una primera dosis de iones de zinc a una concentración de 0,1 mM se alimentó y otra dosis se alimentó el 6º día y se dejó proseguir el proceso hasta el 7º día. La heterogeneidad observada se tabula de la siguiente manera

25

Tabla-9

Ensayo	Edad (h)	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (número de días de cultivo)
Control	168	55,9	30,4	
Matraz alimentado con zn	168	60,5	23,3	3º y 6º día
La figura 9 ilustra los resultados anteriores.				

30

Ejemplo 10: Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo-4

El cultivo celular se realizó en modo “semicontinuo” (fedbatch). En los cultivos “semicontinuos” (fedbatch), las células huésped de mamífero y el medio de cultivo se suministraron inicialmente y los nutrientes se alimentaron periódicamente. El medio de cultivo se inoculó con células a una concentración de  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (el 3º día), la temperatura se cambió de  $37^\circ\text{C}$  a  $31^\circ\text{C}$  y una primera dosis de iones de zn se alimentó a una concentración de 0,1 mM, seguida por otra dosis cuando el recuento celular alcanza  $13-15 \times 10^6$ /ml (el 6º día) a una concentración de 0,1 mM y se permitió proseguir la fermentación hasta el 7º día. La reducción observada de heterogeneidad se tabula de la siguiente manera.

35

40

Tabla-10

Ensayo	Edad (h)	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (número de días de cultivo)
Control	168	58,9	23,3	
Matraz alimentado con zn	168	64,5	18,3	3º y 6º día
La figura 10 ilustra los resultados anteriores.				

**EJEMPLO 11**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo-1

5 El cultivo celular se realizó en modo "semicontinuo" (fedbatch). Medio de cultivo CDM4Mab de Hyclone fue alimentado periódicamente con nutrientes. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (día), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y a continuación se alimentó la primera dosis de zinc a una concentración de 0,15 mM y le siguió otra dosis el 6° día y se permitió proseguir la fermentación hasta el día 7. La reducción observada de heterogeneidad se tabula de la siguiente manera:

Tabla-11

Ensayo	Edad (h)	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (número de días de cultivo)
Control	168	40,7	45,6	
Matraz alimentado con zn	168	46,3	37,4	3° y 6° día

La figura 11 ilustra los resultados anteriores

**EJEMPLO 12**

Uso de iones de zinc para disminuir las variantes básicas o incrementar el pico principal/0 lisina del Anticuerpo-3

15 El cultivo celular se realizó en modo "semicontinuo" (fedbatch). El medio de cultivo CDOptiCHO de Invitrogen fue suministrado periódicamente con nutrientes. El medio de cultivo se inoculó con células a  $0,5-0,6 \times 10^6$ /ml y se les permitió crecer. Una vez que el recuento celular alcanzó  $12-13 \times 10^6$ /ml (día 3) la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y una primera dosis de iones de zinc se alimentó a una concentración de 0,1 mM, seguida por otra dosis el día 6 y se permitió proseguir la fermentación hasta el día 8. La reducción observada de heterogeneidad se tabula de la siguiente manera:

Tabla-12

Ensayo	Edad (h)	0 Lisina (%)	% de básicas (L1+L2)	Alimentación de zn (número de días de cultivo)
Control	192	61,5	23	
Matraz alimentado con zn	192	65,6	19,2	3° y 6° día

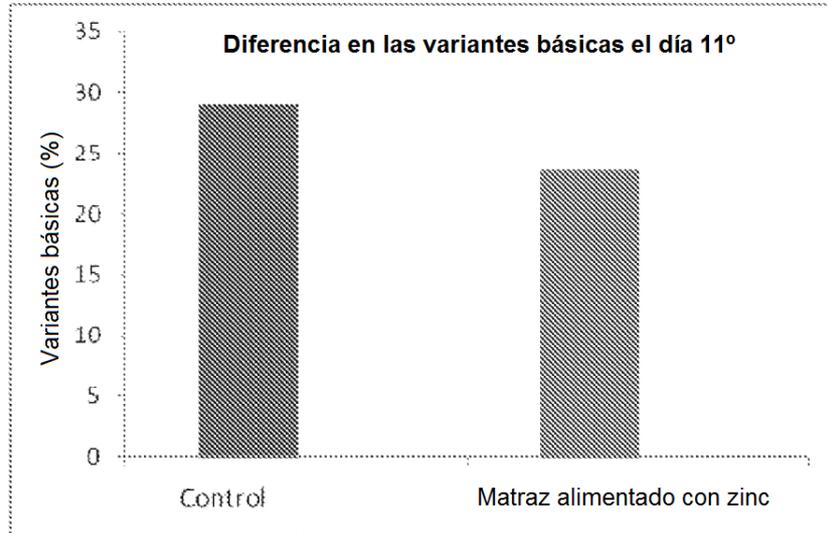
La figura 12 ilustra los resultados anteriores

## REIVINDICACIONES

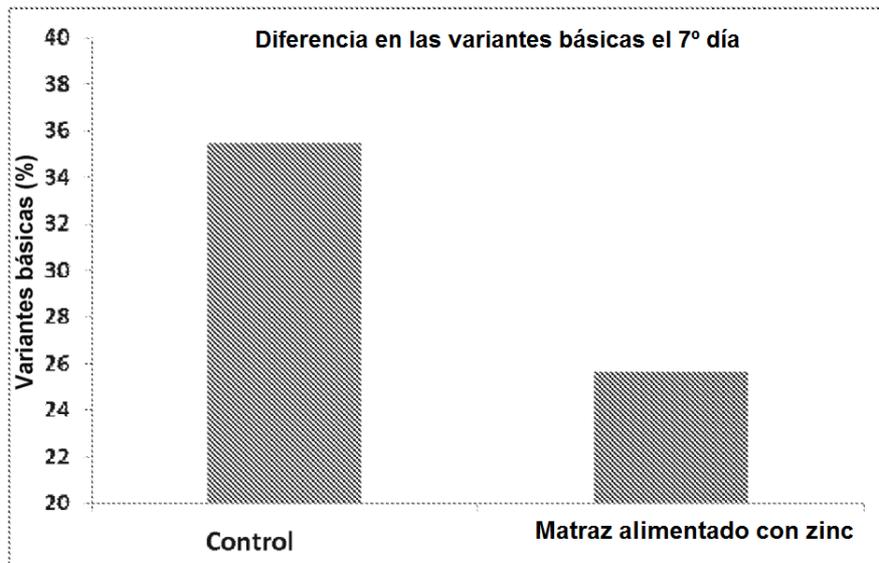
- 5 1. Un método de reducción de la heterogeneidad en anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular reduciendo la proporción de resto de lisina en el extremo C de los anticuerpos, dicho método comprende añadir un ion metálico de transición divalente al medio de cultivo de producción de anticuerpos o alterar la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos para obtener dichos anticuerpos con heterogeneidad reducida.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la heterogeneidad se debe a la proporción de variante de carga del anticuerpo y la heterogeneidad se reduce llevando a cabo dicho método para una proporción de anticuerpos que varía entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 %, en donde la reducción de la heterogeneidad de la proporción de variante básica del anticuerpo está entre el 3 % y el 30 % y el incremento del pico principal/0 lisina de anticuerpo está entre el 5 % y el 25 %.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de origen natural o un anticuerpo recombinante seleccionado entre un grupo que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo modificado, un derivado de anticuerpo y un fragmento de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la adición de los iones metálicos de transición divalentes se lleva a cabo en primer lugar durante la fase de crecimiento celular y en segundo lugar durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular; o en el que la adición del ion metálico se lleva a cabo en una fase inicial antes de dicho cultivo de las células; en el que el ion metálico es  $Zn^{+2}$ , a una concentración que varía entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 1,5 mM.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la osmolalidad del medio de cultivo se reduce para proporcionar una osmolalidad que varía entre aproximadamente 240 mOsm/kg y aproximadamente 260 mOsm/kg.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo es cultivo semicontinuo; y comprende cultivo de células de mamífero, preferentemente cultivo de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).
- 35 7. Un proceso para producir un anticuerpo que tiene heterogeneidad reducida reduciendo la proporción de resto de lisina en el extremo C del anticuerpo, comprendiendo dicho proceso acciones de:
- a. cultivar células en medio de cultivo para producir el anticuerpo y añadir iones metálicos de transición divalentes al medio de cultivo o alterar la osmolalidad del medio de cultivo o una combinación de los mismos; y
  - b. recuperar el anticuerpo del medio de cultivo que tiene la heterogeneidad reducida.
- 40 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7 (a), en el que las células se cultivan a una concentración que varía entre aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células/ml; en el que el cultivo se lleva a cabo a temperaturas que varían entre aproximadamente 36 °C y aproximadamente 38 °C.
- 45 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de origen natural o un anticuerpo recombinante seleccionado entre un grupo que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo modificado, un derivado de anticuerpo y un fragmento de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos.
- 50 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la heterogeneidad se debe a la proporción de variante de carga del anticuerpo y la heterogeneidad se reduce llevando a cabo dicho método para una proporción de anticuerpos que varía entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 %, en donde la reducción de la heterogeneidad de la proporción de variante básica del anticuerpo es del 3 % al 30 % y el incremento del pico principal/0 lisina del anticuerpo es del 5 % al 25 %.
- 55 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cultivo es cultivo semicontinuo; y comprende cultivo de células de mamífero, preferentemente cultivo de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).
- 60 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la adición de los iones metálicos de transición divalentes se lleva a cabo en primer lugar durante la fase de crecimiento celular y en segundo lugar durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo a temperaturas que varían entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 32 °C; o en el que la adición de los iones de transición divalentes metálicos se lleva a cabo en una fase inicial antes de dicho cultivo de las células, en donde la osmolalidad del medio de cultivo se reduce para proporcionar una osmolalidad que varía entre aproximadamente 240 mOsm/kg y aproximadamente 260 mOsm/kg; en el que el ion metálico es  $Zn^{+2}$ , a una concentración que varía entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 1,5 mM.
- 65 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la fase de crecimiento celular tiene una concentración de células que varía entre aproximadamente  $12 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $13 \times 10^6$  células/ml; y en el que la fase de producción de polipéptidos tiene una concentración de células que varía entre aproximadamente  $13 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml.

14. Un método de reducción de la heterogeneidad en anticuerpos obtenidos mediante cultivo celular, dicho método comprende alterar la osmolalidad del medio de cultivo para obtener los anticuerpos con heterogeneidad reducida.

5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la osmolalidad del medio de cultivo varía entre aproximadamente 240 mOsm/kg y aproximadamente 260 mOsm/kg.



**Figura 1**



**Figura 2a**

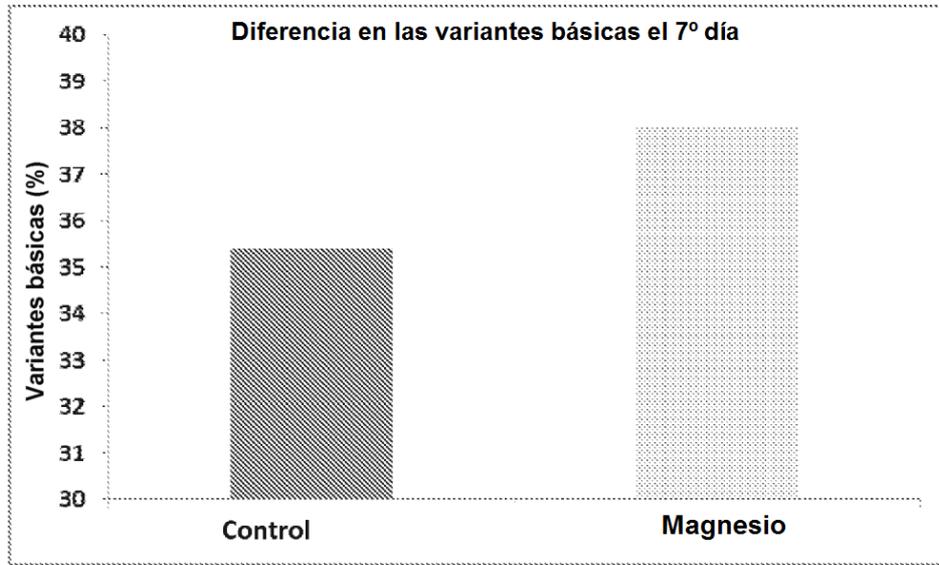


Figura 2b

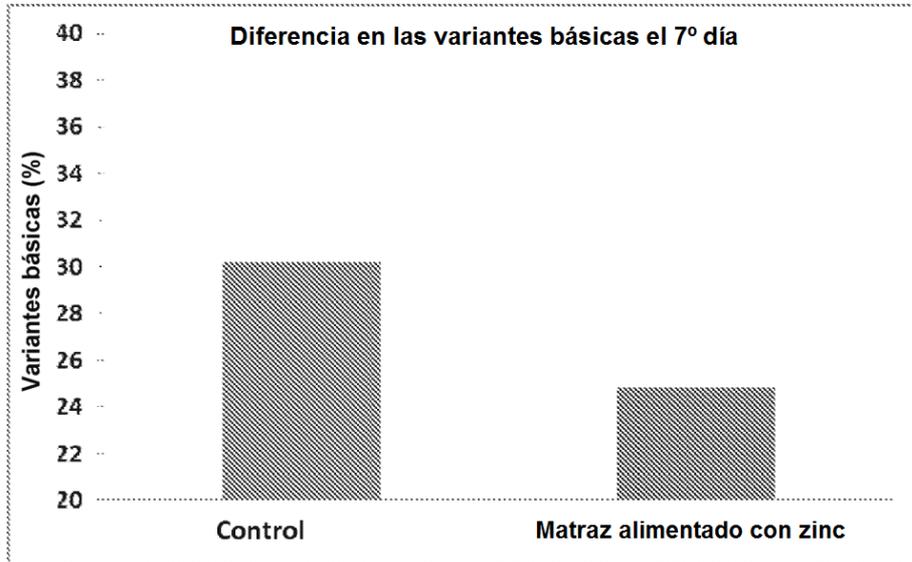


Figura 3

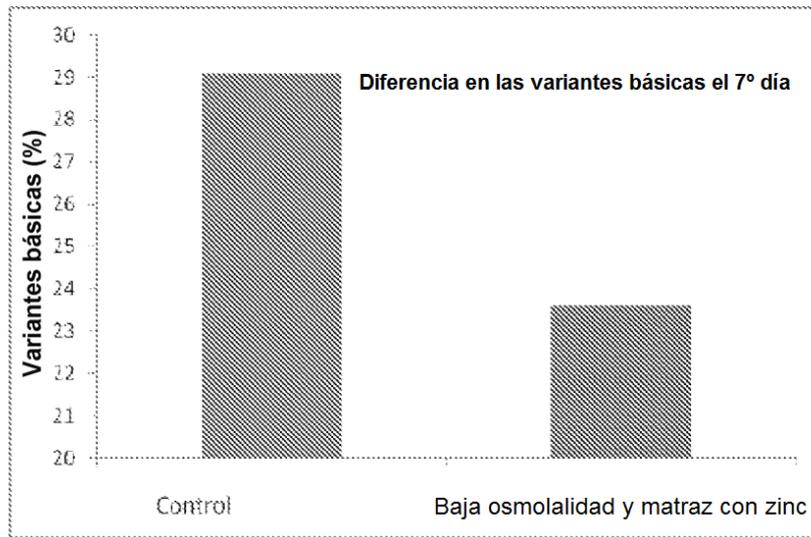


Figura 4

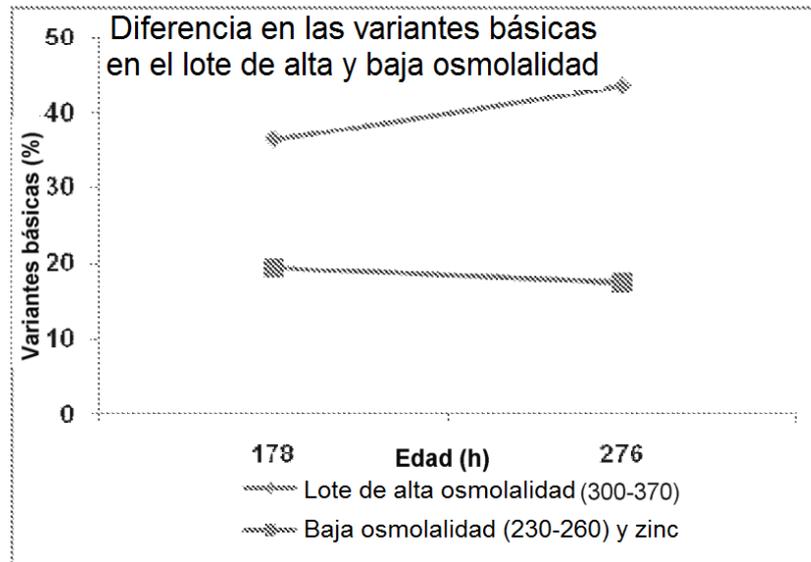
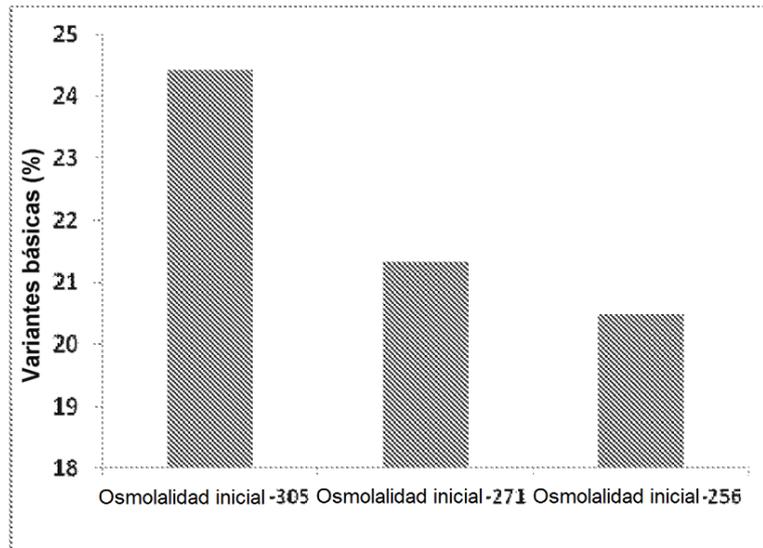
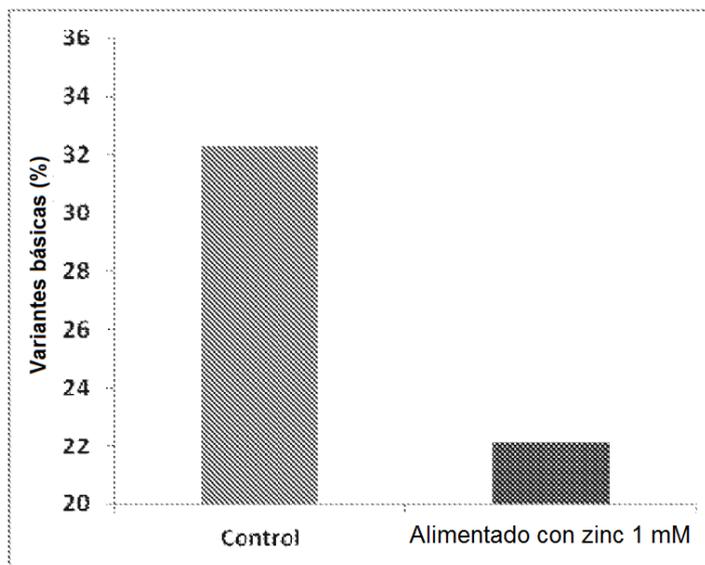


Figura 5



**Figura 6**



**Figura 7**

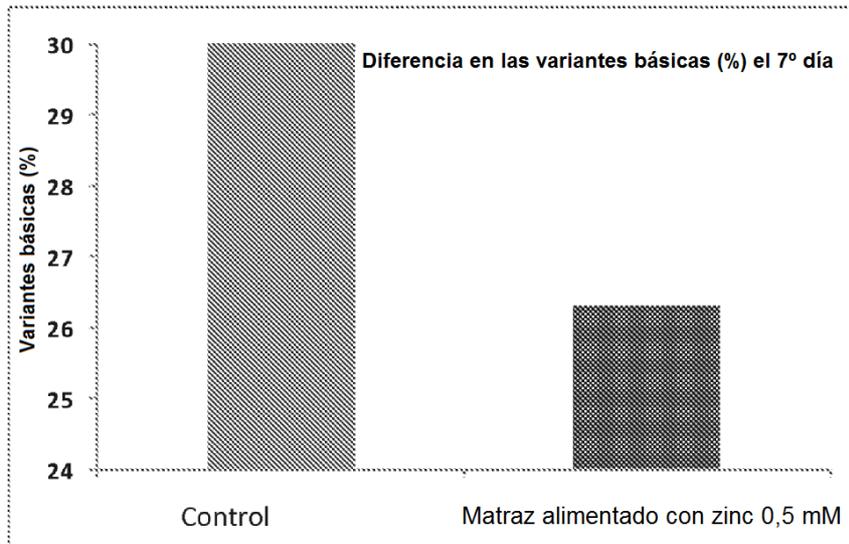


Figura 8

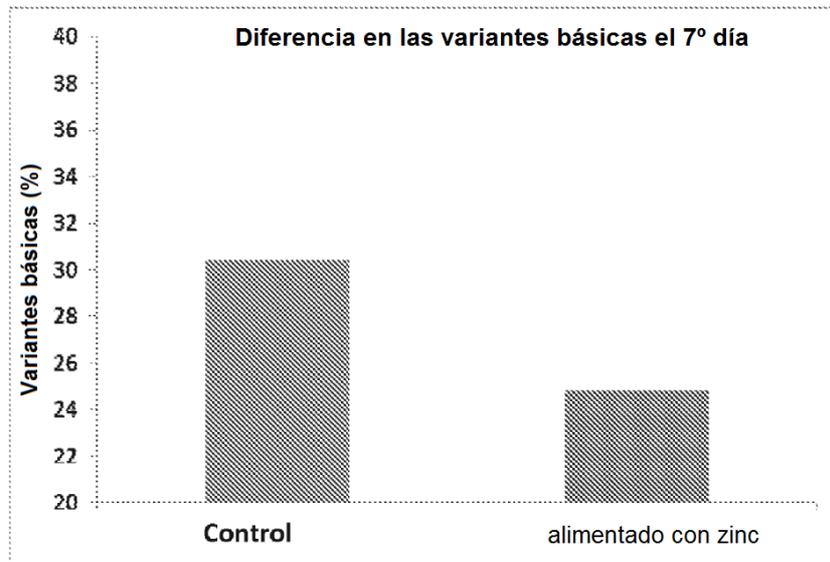


Figura 9

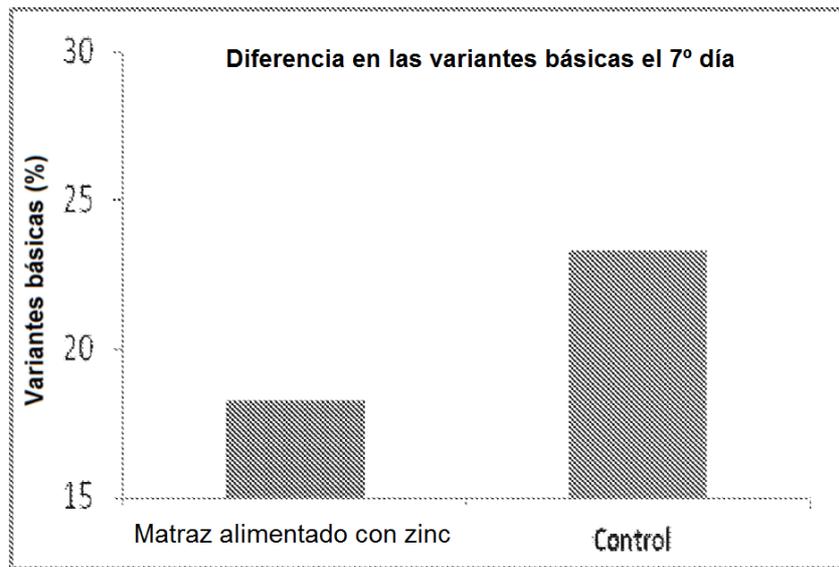


Figura 10

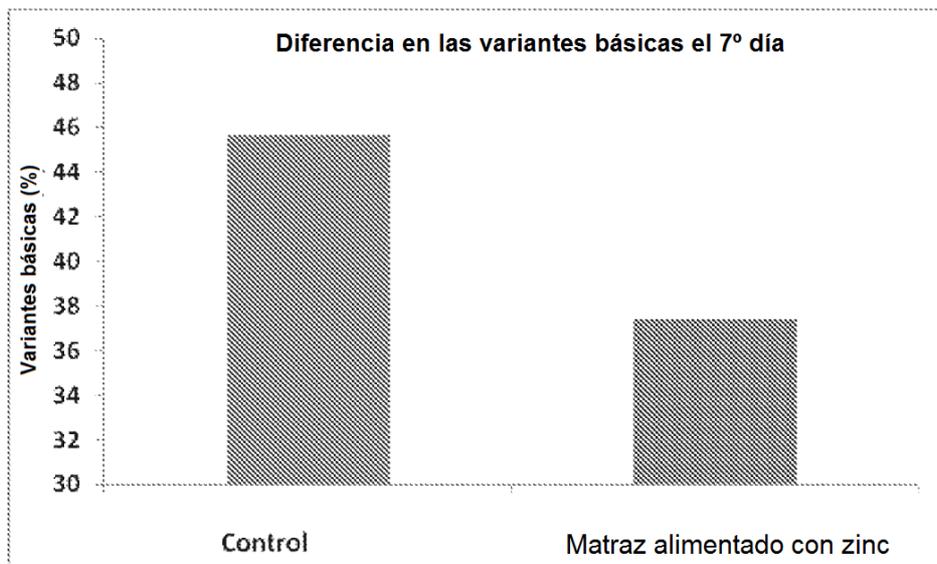


Figura 11

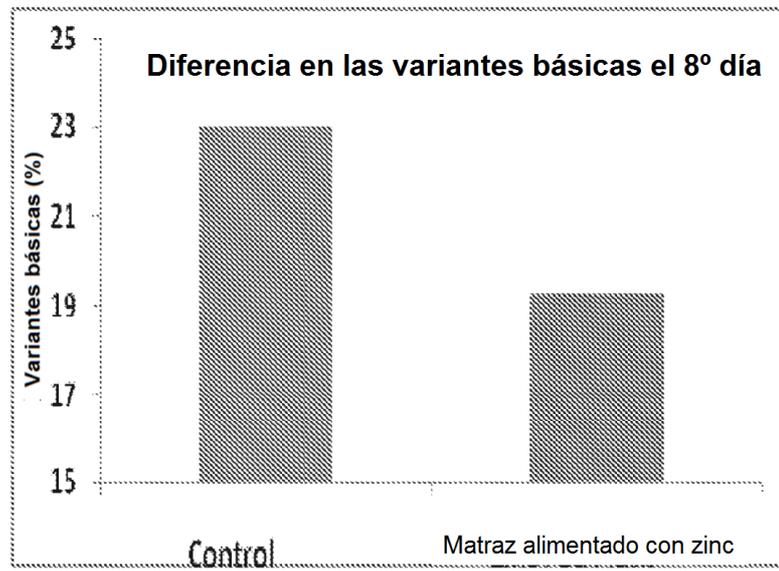


Figura 12