

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 301**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2013 PCT/US2013/037992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2013 E 13720203 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2841561**

54 Título: **Composiciones de cultivos de células y procedimientos para la producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

24.04.2012 US 201261637778 P
24.04.2012 US 201261637780 P
15.03.2013 US 201313841864

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:

MEIER, STEVEN, J.;
MUN, MELISSA, S.;
VIJAYASANKARAN, NATARAJAN;
VARMA, SHARAT;
YANG, YI;
ZHANG, BOYAN;
AREVALO, SILVANA, R.;
GAWLITZEK, MARTIN y
CARVALHAL, VERONICA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 716 301 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

Composiciones de cultivos de células y procedimientos para la producción de polipéptidos

5 **Antecedentes de la invención**

Los procedimientos de producción de proteínas *in vitro* usando cultivos de células recombinantes se conocen bien y se usan a una escala industrial para producir especialidades farmacéuticas basadas en proteínas. Sin embargo, persisten problemas significativos para la preparación eficaz de proteínas a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, una especialidad farmacéutica basada en proteínas tiene determinados atributos de calidad, tales como la distribución de tamaños, integridad de secuencia y color de producto, que se pueden ver afectados por el procedimiento de producción de proteínas.

Un atributo de calidad de particular interés es el color de una especialidad farmacéutica de proteínas. También se deben cumplir los requisitos reglamentarios con respecto a los niveles de color aceptables para las especialidades farmacéuticas basadas en proteínas. Por tanto, la producción de un producto de proteínas que tenga un color aceptable (por ejemplo, para satisfacer los requisitos reglamentarios para la comercialización del producto) es un aspecto importante de la producción de fármacos. El establecimiento de la comparabilidad de la calidad del producto con el material clínico anterior también puede ser crítico.

Las tendencias recientes hacia la administración subcutánea de anticuerpos monoclonales se han visto acompañadas por un incremento en la concentración de la sustancia farmacéutica formulada (por ejemplo, a ≥ 150 mg/ml). A estas concentraciones, el color de la especialidad farmacéutica puede ser más intenso, lo que dificulta la producción de una especialidad farmacéutica basada en proteínas que tenga un color aceptable. Las condiciones de cultivo de células pueden afectar a los atributos de calidad de las especialidades farmacéuticas basadas en proteínas. Los medios en los que se cultivan las células pueden afectar significativamente, en particular, a la producción de proteínas.

Las técnicas de ADN recombinante para producir proteínas *in vitro* han empleado históricamente líneas de células cultivadas en medios enriquecidos con componentes en los medios variables y químicamente indefinidos, tales como sueros y peptona animales. Los nutrientes químicamente indefinidos pueden dar lugar a variabilidad de lote a lote y los productos derivados de animal pueden contaminar los medios con constituyentes indeseables. Se han desarrollado medios de cultivo de células ("CDM") químicamente definidos que son de una composición conocida que es consistente de lote a lote para abordar estas preocupaciones. Debido a las diversas ventajas asociadas con el uso de CDM para la producción de proteínas, existe una gran tendencia en toda la industria de alejarse de los procedimientos que contienen suero y que contienen peptona en favor de los procedimientos que utilizan CDM. Se han descrito diversos CDM en la literatura de patente, tales como en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 5.691.202; 6.048.728; 6.900.056; y 7.601.535, y en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.ºs 20030087372 y 20110039330. Sin embargo, los medios químicamente indefinidos continúan encontrando uso en la producción de proteínas. El documento EP0591605A2 se refiere a procedimientos para suprimir la coloración de la seroalbúmina humana.

Existe una necesidad continua de proporcionar procedimientos mejorados y rentables de producción de proteínas (por ejemplo, anticuerpos) *in vitro* que tengan atributos de calidad del producto aceptables. Se desean medios de cultivo de células que modulen uno o más atributos de calidad del producto. Los medios de cultivo de células, ya sean químicamente indefinidos o químicamente definidos, que tienen componentes que administran de forma consistente productos de proteínas a intensidades de color más bajas mientras que mantienen una concentración de proteínas deseada (por ejemplo, ≥ 150 mg/ml), encontrarían uso en el desarrollo de productos de proteínas, tales como anticuerpos, por ejemplo, para inyección subcutánea.

Breve resumen de la invención

Se describen composiciones de medios de cultivo de células que proporcionan una especialidad farmacéutica con un color aceptable, así como procedimientos de uso de los medios para el crecimiento de las células (es decir, cultivo de células) y/o la producción de proteínas. En particular, la invención proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo de células una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que:

a) el medio de cultivo de células comprende:

de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;

de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2;

de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6;

de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9;

de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; y

citrato férrico o sulfato ferroso;

5 b) la célula expresa el polipéptido; y

c) el polipéptido se aísla del medio de cultivo de células, en el que el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.

15 En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina.

En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende: cistina de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,5 mM; vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μ M a aproximadamente 0,72 μ M;

20 vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μ M a aproximadamente 30,0 μ M; vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μ M a aproximadamente 22,0 μ M; y vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μ M a aproximadamente 1,5 μ M.

En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.

25 En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de: vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μ M a aproximadamente 14,0 μ M; vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μ M a aproximadamente 72,0 μ M; vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μ M a aproximadamente 44,0 μ M; y vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μ M a aproximadamente 0,14 μ M.

30 En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende citrato férrico o sulfato ferroso a una concentración de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M.

En un modo de realización particular, el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona, opcionalmente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M.

35 En un modo de realización particular, el polipéptido es un anticuerpo, opcionalmente en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

40 En un modo de realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF, antimesotelina, anti-PCSK9 o anti-Beta7.

45 En un modo de realización particular, el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 125 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.

50 En un modo de realización particular, el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 150 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.

55 En un modo de realización particular, se determina el color del polipéptido aislado mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de COC, el ensayo de color total y el ensayo de NIFTY.

60 También se describen medios que proporcionan especialidades farmacéuticas basadas en proteínas con un color aceptable mientras que mantienen una concentración de especialidad farmacéutica basada en proteínas deseada (por ejemplo, ≥ 100 mg/ml o ≥ 150 mg/ml) y pueden encontrar uso en procedimientos de producción de proteínas, tales como para la producción de anticuerpos para inyección subcutánea. Los medios de cultivo de células como se detalla en el presente documento pueden ser químicamente indefinidos o CDM. También se contemplan composiciones que comprenden un medio como se describe en el presente documento y un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido segregado por una célula huésped en el medio) y/o una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido. Se proporcionan polipéptidos preparados mediante los procedimientos detallados en el presente documento, así como formulaciones que comprenden los polipéptidos y un vehículo (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las formulaciones de polipéptido en un aspecto tienen un color aceptable y mantienen

una concentración de especialidad farmacéutica basada en proteínas de al menos 100 mg/ml o 150 mg/ml.

Los medios de cultivo de células detallados en el presente documento comprenden, en general, uno o más de los siguientes componentes en una cantidad para conseguir un atributo de calidad del producto de proteínas, tal como el color: (a) cistina o cisteína; (b) vitamina B2, (c) vitamina B6 (piridoxina y/o piridoxal, que se pueden proporcionar como la sal HCl), (d) vitamina B9, (e) vitamina B12, (f) una fuente de hierro, tal como nitrato de hierro, citrato férrico o sulfato ferroso y (g) hidrocortisona. En una variación, un medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g). Se entiende que un medio de cultivo de células descrito en el presente documento puede contener cualquier combinación de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g), igual que si todas y cada una de las combinaciones se enumerara específica e individualmente. En un aspecto, los medios de cultivo de células son un CDM. En otro aspecto de la divulgación, los medios de cultivo de células son químicamente indefinidos. En una variación particular, un medio de cultivo de células detallado en el presente documento comprende: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12, y donde el medio de cultivo de células (a) puede ser un CDM en una variación y/o (b) puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M), y (2) hidrocortisona (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M). En otra variación, un medio de cultivo de células como se detalla en el presente documento comprende: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) citrato férrico de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M; y (c) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M, y donde el medio de cultivo de células (1) puede ser un CDM en una variación y/o (2) puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (A) vitamina B2 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l); (B) vitamina B6 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l); (C) vitamina B9 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l); y (D) vitamina B12 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l). Para cualquier medio descrito en el presente documento, en una variación, el medio reduce la presencia de variantes de carga (que en un aspecto son variantes de carga ácidas) cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga (que en un aspecto son variantes de carga ácidas) obtenidas cuando el polipéptido se produce en un medio de cultivo de células diferente (por ejemplo, un medio que no comprenda los mismos componentes en el medio o contenga los mismos componentes en el medio, pero en una cantidad diferente). En una variación de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, las variantes de carga (que en un aspecto son variantes de carga ácidas) constituyen no más de un 25 % o 20 % o 18 % o 15 % o 10 % del producto de polipéptidos. En otra variación de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, al menos un 75 % u 80 % u 85 % o 90 % o 95 % o más del producto de polipéptidos es una proteína de la especie principal. En algunas variaciones, la proteína de la especie principal es una proteína cuantitativamente predominante identificada mediante la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria y/o la estructura terciaria de la proteína. En algunas variaciones, la proteína de la especie principal es una proteína cuantitativamente predominante que se identifica mediante una o más modificaciones postraduccionales. En algunas variaciones, la modificación postraduccionales es la glucosilación. Se entiende que se puede determinar un porcentaje de un producto de polipéptidos como se describe en el presente documento antes de la purificación del producto de polipéptidos, después de la purificación del producto de polipéptidos, o en cualquier etapa durante un procedimiento de purificación de polipéptidos.

Las variantes ácidas se pueden evaluar mediante una variedad de procedimientos, pero preferentemente dichos procedimientos incluyen uno, dos, tres, cuatro o cinco de: cromatografía de intercambio iónico (IEC), en la que la composición se trata con sialidasa antes, después y/o durante la IEC (por ejemplo, para evaluar la variante sialilada), CE-SDS reducida (por ejemplo, para evaluar la variante reducida de disulfuro), CE-SDS no reducida (por ejemplo, para evaluar la variante no reducible), cromatografía con boronato (por ejemplo, para evaluar la variante glucada) e identificación genética (por ejemplo, para evaluar la variante desamidada). En una variación, se evalúan las variantes ácidas globales mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, usando un intercambiador catiónico débil y/o un intercambiador catiónico con un grupo funcional carboxilato (por ejemplo, usando una columna de cromatografía DIONEX PROP AC™ WCX-10).

En otro aspecto de la divulgación, los medios de cultivo de células detallados en el presente documento comprenden, en general, uno o más de los siguientes componentes en una cantidad para conseguir un atributo de calidad del producto de proteínas, tal como el color: (a) cistina; (b) vitamina B1; (c) vitamina B2; (d) vitamina B3; (e) vitamina B5; (f) vitamina B6 (piridoxina y/o piridoxal, que se pueden proporcionar como la sal HCl); (g) vitamina B7; (h) vitamina B9; (i) vitamina B12; y (j) una fuente de hierro, tal como nitrato de hierro, citrato férrico o sulfato ferroso. En una variación, un medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) y (j). Se entiende que un medio de cultivo de células descrito en el presente documento puede contener cualquier combinación de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) y (j), igual que si todas y cada una de las combinaciones se enumerara específica e individualmente. En un aspecto, los medios de cultivo de células

son un CDM. En otro aspecto, los medios de cultivo de células son químicamente indefinidos. En una variación particular, un medio de cultivo de células detallado en el presente documento comprende: (a) cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos modos de realización, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; (b) vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ; (c) vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ; (d) vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y (e) vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , y donde el medio de cultivo de células (a) puede ser un CDM en una variación y/o (b) puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM), (2) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (3) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (4) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (5) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).

El uso de los medios de cultivo de células detallados en el presente documento puede incrementar la estabilidad (por ejemplo, estabilidad física y/o estabilidad química) de un producto de proteínas, tal como reduciendo la oxidación de una proteína de la especie principal, en comparación con los productos de proteínas producidos en un medio de cultivo de células, es decir, de una composición diferente (por ejemplo, un medio que no comprenda los componentes en los medios y/o la cantidad de componentes como se detalla en el presente documento). El uso de los medios de cultivo de células detallados en el presente documento también puede reducir las formas coloreadas de un producto de polipéptidos en comparación con los productos de polipéptidos producidos en un medio que sea de una composición diferente (por ejemplo, un medio que no comprenda los componentes en los medios y/o la cantidad de componentes como se detalla en el presente documento). El uso de los medios de cultivo de células detallados en el presente documento también puede reducir la unión de un producto de polipéptidos a otras sustancias en un recipiente de cultivo de células (por ejemplo, aductos) en comparación con los productos de polipéptidos producidos en un medio que sea de una composición diferente (por ejemplo, un medio que no comprenda los componentes en los medios y/o la cantidad de componentes como se detalla en el presente documento). Se contempla un procedimiento de incremento de la estabilidad de una composición de polipéptido, así como procedimientos de reducción de la presencia y/o cantidad de una forma coloreada de un producto de polipéptidos y de reducción de la unión de un producto de polipéptidos a otras sustancias en un recipiente de cultivo de células, tal como aductos.

También se proporcionan procedimientos de preparación de una formulación que comprende un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo), que comprenden las etapas de producción de un polipéptido como se proporciona mediante cualquier procedimiento detallado en el presente documento y combinación del polipéptido con uno o más componentes en la formulación, tal como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona una formulación que comprende un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) producido mediante cualquier procedimiento detallado en el presente documento. Una formulación puede comprender un polipéptido y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una formulación de polipéptido, que puede ser adecuada para su administración a un individuo, puede comprender un anticuerpo aislado y/o purificado y tener uno o más atributos de calidad del producto deseables, tales como un color aceptable. En un aspecto, una formulación que comprende un producto de polipéptidos obtenido mediante cualquiera de los procedimientos proporcionados en el presente documento comprende el polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml o al menos 150 mg/ml. Las formulaciones que comprenden al menos 100 mg/ml o al menos 150 mg/ml de producto de polipéptidos (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo IgG1) también pueden ser de un color aceptable. Dichas formulaciones pueden ser adecuadas para su inyección, tal como inyección subcutánea en un individuo, que en un aspecto es un ser humano. En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos adecuada para su inyección está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. Se entiende que el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R), en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos adecuada para su inyección está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). Las formulaciones como se proporcionan en el presente documento pueden comprender un producto de polipéptidos donde no más de un 25 % o 20 % o 18 % o 15 % o 10 % del producto de polipéptidos es una variante de carga del polipéptido (que en un aspecto es una variante de carga ácida). Las formulaciones como se detalla en el presente documento también pueden comprender un producto de polipéptidos donde al menos un 75 % u 80 % u 85 % o 90 % o 95 % o más del producto de polipéptidos sea una proteína de la especie principal. En una variación particular, se proporciona una formulación que comprende un producto de polipéptidos (por ejemplo, un anticuerpo) donde la formulación comprende el producto de polipéptidos a una concentración mayor de 100 mg/ml o mayor de 125 mg/ml o mayor de 150 mg/ml y donde la formulación es de un color aceptable y donde no más de un 25 % o 20 % o 18 % o 15 % o 10 % del producto de polipéptidos es una variante de carga del polipéptido (que en un aspecto es una variante de carga ácida).

También se describen composiciones que comprenden el medio de cultivo de células y uno o más de otros componentes, tales como una célula y/o un polipéptido deseado (por ejemplo, un anticuerpo). Las composiciones engloban todas y cada una de las fases del cultivo de células, tales como siembra, crecimiento de las células y producción/mantenimiento de las células. En una variación, se describe una composición que comprende: (a) una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento. En otra variación se describe una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento, donde en un aspecto el polipéptido se segrega en el medio por una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido o se libera en el medio mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. La célula de la composición puede ser cualquier célula detallada en el presente documento (por ejemplo, una célula CHO) y el medio de cultivo de células de la composición puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, igual que si todas y cada una de las combinaciones de célula y medio se enumerara específica e individualmente. Asimismo, el polipéptido de la composición puede ser cualquier polipéptido detallado en el presente documento y el medio de la composición puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, igual que si todas y cada una de las combinaciones de polipéptido y medio se enumerara específica e individualmente.

Se proporcionan procedimientos de cultivo de células (es decir, cultivar células) poniendo en contacto las células con un medio de cultivo de células como se detalla en el presente documento. En una variación particular de un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula), el medio de cultivo de células es un CDM. En una variación, un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12, donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM), y (2) hidrocortisona (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,25 μM). En otra variación, se proporciona un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) donde el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; y (c) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM , donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B2 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l); (2) vitamina B6 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l); (3) vitamina B9 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l); y (4) vitamina B12 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l). En cualquier procedimiento de cultivo de células (es decir, cultivar células) proporcionado en el presente documento, las células se pueden poner en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento y/o la fase de producción de las células. Se contempla el contacto de las células con el medio detallado en el presente documento en cualquier fase del cultivo de células, tal como durante el crecimiento, producción y mantenimiento de las células. Como se entiende por un experto en la técnica, las células se ponen en contacto con un medio como se detalla en el presente documento en condiciones (por ejemplo, temperatura, pH, osmolalidad, etc.) que promuevan el mantenimiento y/o crecimiento de las células, incluyendo la producción de un polipéptido.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende: (a) cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos modos de realización, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; (b) vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ; (c) vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ; (d) vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y (e) vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , y donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM), (2) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (3) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (4) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (5) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).

Aún en otro aspecto de la divulgación, un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM; citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM ; vitamina B2 de aproximadamente

- 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ; vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ; vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , y donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).
- También se proporcionan procedimientos de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en los que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células comprende: (1) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (2) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (3) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (4) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y (5) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12, y donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (A) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM) y (B) hidrocortisona (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,25 μM). En otra variación, se proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivando en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células comprende: (1) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (2) citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; y (3) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM , donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (A) vitamina B2 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l); (B) vitamina B6 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l); (C) vitamina B9 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l); y (D) vitamina B12 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l).
- En otro aspecto de la divulgación, también se proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células comprende: (a) cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos modos de realización, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; (b) vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ; (c) vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ; (d) vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y (e) vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , y donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM), (2) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (3) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (4) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (5) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).
- Aún en otro aspecto de la divulgación, también se proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células comprende: cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM; citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM ; vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ; vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ; vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , y donde el medio de cultivo de células puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).
- El polipéptido producido mediante un procedimiento o presente en una composición descritos en el presente documento puede ser un anticuerpo en una variación, tal como un anticuerpo IgG1. En un aspecto, el polipéptido

producido mediante un procedimiento o presente en una composición descritos en el presente documento es un anticuerpo anti-VEGF, anti-mesotelina, anti-PCSK9 o anti-Beta7. Los polipéptidos producidos de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento o presentes en las composiciones descritas se pueden aislar del medio de cultivo de células y se pueden purificar adicionalmente. También se pueden concentrar los polipéptidos (tales como anticuerpos) para lograr una concentración deseable. Se conocen procedimientos de concentración de polipéptidos en el campo, por ejemplo, la concentración de un polipéptido o proteína se puede incrementar usando ultrafiltración. En una variación particular, el polipéptido se aísla a una concentración de al menos 100 mg/ml o 150 mg/ml y/o aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. En una variación particular, una composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos 100 mg/ml y/o aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. En otra variación, una composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml y/o aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. En otra variación, una composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml y/o aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. En otra variación, una composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml y/o aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. También se describe una composición que comprende un polipéptido obtenido mediante un procedimiento detallado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, comprendiendo el kit: (a) cistina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina en el medio de cultivo de células; (b) vitamina B2 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2 en el medio de cultivo de células; (c) vitamina B6 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 en el medio de cultivo de células; (d) vitamina B9 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 en el medio de cultivo de células; y (e) vitamina B12 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 en el medio de cultivo de células, donde el kit puede comprender además uno o más de los siguientes componentes (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar la fuente de hierro a una concentración de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M) y (2) hidrocortisona (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar hidrocortisona a una concentración de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M). En otra variación, se describe un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, comprendiendo el kit: (a) cistina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina en el medio de cultivo de células; (b) citrato férrico en una cantidad para proporcionar una concentración de citrato férrico de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M en el medio de cultivo de células; y (c) hidrocortisona en una cantidad para proporcionar una concentración de hidrocortisona de desde aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M en el medio de crecimiento de las células (es decir, cultivo de células), donde el kit puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B2 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2 en el medio de cultivo de células); (2) vitamina B6 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 en el medio de cultivo de células); (3) vitamina B9 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 en el medio de cultivo de células); y (4) vitamina B12 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 en el medio de cultivo de células). En el presente documento también se proporciona un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, en el que el kit comprende: (a) cistina en una cantidad para proporcionar cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos modos de realización, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM en el medio de cultivo de células; (b) vitamina B2 en una cantidad para proporcionar vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μ M a aproximadamente 0,72 μ M en el medio de cultivo de células; (c) vitamina B6 en una cantidad para proporcionar vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μ M a aproximadamente 30,0 μ M en el medio de cultivo de células; (d) vitamina B9 en una cantidad para proporcionar vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μ M a aproximadamente 22,0 μ M en el medio de cultivo de células y (e) vitamina B12 en una cantidad para proporcionar vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μ M a aproximadamente 1,5 μ M en el medio de cultivo de células, y donde el kit puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 11,0 μ M a aproximadamente 36,0 μ M en el medio de cultivo de células), (2) vitamina B1 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 2,0 μ M a aproximadamente 14,0 μ M en un medio de cultivo de células), (3) vitamina B3 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 11,0 μ M a aproximadamente 72,0 μ M en un medio de cultivo de células), (4) vitamina B5 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 6,8 μ M a aproximadamente 44,0 μ M en un medio de cultivo de células), y (5) vitamina B7 (que en un aspecto está en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,02 μ M a aproximadamente 0,24 μ M en un medio de cultivo de células). Los kits también pueden comprender instrucciones de uso, tales como instrucciones para preparar un medio (por ejemplo, un CDM) y/o para producir polipéptidos (incluyendo anticuerpos) a partir de un sistema de cultivo de células.

Breve descripción de los dibujos

5 La **figura 1** es una imagen que muestra el ensayo de COC para muestras de anticuerpo aisladas de líneas de células cultivadas en diversas condiciones de cultivo de células. De izquierda a derecha, los viales contienen formulaciones con anticuerpos aislados de células cultivadas en: I) medios químicamente indefinidos; II) los medios base 1 y los medios de alimentación 2; III) los medios base 1 y los medios de alimentación 2; IV) los medios base 5 y los medios de alimentación 4; V) los medios base 5 y los medios de alimentación 2; VI) los medios base 3 modificados que contienen cisteína en lugar de cistina y los medios de alimentación 4; VII) los medios base 3 y los medios de alimentación 4; y VIII) los medios base 3 modificados que contienen cisteína en lugar de cistina y los medios de alimentación 4. Los valores de COC se representan encima de los viales. Todos los viales contienen aproximadamente 150 g/l de proteína. La formulación III, IV y VI tenía un valor de intensidad de color de 1,59, 1,47 y 0,71, respectivamente, medido mediante el ensayo de NIFTY. La formulación III, IV y VI tenía un valor de intensidad de color de 2,62, 2,04 y 1,00, respectivamente, medido mediante el ensayo de color total.

15 La **figura 2** es una serie de gráficos que muestran una ligera reducción del número de células y la producción de anticuerpos en cultivos de células incubados con medios base 3 y medios de alimentación 4 en comparación con medios base 1 y medios de alimentación 2. **A y C)** Número de células en cultivo durante la duración de la incubación medido mediante el hematocrito (PCV) expresado como porcentaje del volumen de cultivo total. **B y D)** Producción de anticuerpos en cultivo de células durante la duración de la incubación medida mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento y expresada como valor de anticuerpos.

20 La **figura 3** es una serie de gráficos que muestran el efecto sobre la biomasa productiva de células y la producción de anticuerpos por cultivos de células cultivados en medios químicamente definidos (CDM) que contienen concentraciones variables de vitamina B2, vitamina B6 y vitamina B9 junto con vitamina B12. **A)** Biomasa productiva en cultivo medida mediante el hematocrito (PCV) expresada como porcentaje del volumen de cultivo total. **B)** Producción de anticuerpos a partir de células medida mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento y expresada como valor de anticuerpos. Para la vitamina B2, -1 indica 0,25 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 1,41 mg/l con 10 mg/l de alimentación; para la vitamina B6, -1 indica 5,35 mg/l de base (piridoxina) con 0 mg/l de alimentación y 1 indica piridoxina a 15,42 mg/l de base con 7 mg/l de alimentación en combinación con piridoxal a 0 mg/l de base con 60 mg/l de alimentación; para la vitamina B9, -1 indica 8,61 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 9,93 mg/l de base con 197 mg/l de alimentación; para la vitamina B12, -1 indica 1,76 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 3,05 mg/l de base con 48 mg/l de alimentación. La línea central indica el valor predicho calculado a partir de un modelo lineal que se deriva de los datos. Las líneas superior e inferior indican un intervalo de confianza de un 95 % de la predicción.

25 La **figura 4** es una serie de gráficos que muestran la intensidad de color de anticuerpos aislados de cultivos de células cultivados en CDM que contienen concentraciones variables de vitamina B2, vitamina B6 y vitamina B9 junto con vitamina B12. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Para la vitamina B2, -1 indica 0,25 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 1,41 mg/l de base con 10 mg/l de alimentación; para la vitamina B6, -1 indica 5,35 mg/l de base (piridoxina) con 0 mg/l de alimentación y 1 indica piridoxina a 15,42 mg/l de base con 7 mg/l de alimentación en combinación con piridoxal a 0 mg/l de base con 60 mg/l de alimentación; para la vitamina B9, -1 indica 8,61 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 9,93 mg/l de base con 197 mg/l de alimentación; para la vitamina B12, -1 indica 1,76 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 3,05 mg/l de base con 48 mg/l de alimentación.

30 La **figura 5 A-C)** es una serie de gráficos que muestran la biomasa productiva de células, la producción de anticuerpos y la intensidad de color de anticuerpos aislados de cultivos de células cultivados en CDM que contienen concentraciones crecientes de sulfato ferroso. **A)** Biomasa productiva en cultivo medida mediante el hematocrito con el tiempo (IVPCV). **B)** Producción de anticuerpos a partir de células medida mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. **C)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Las barras indican la extensión superior e inferior de los datos y la media. **D)** es un gráfico que muestra la intensidad de color de anticuerpos incubados en medios que contenían concentraciones crecientes de sulfato ferroso en un experimento *in vitro*.

35 La **figura 6** es una serie de gráficos que muestran la biomasa productiva de células, la producción de anticuerpos y la intensidad de color de anticuerpos aislados de cultivos de células cultivados en CDM que contienen concentraciones crecientes de hierro y con fuentes variables de hierro. **A)** Biomasa productiva en cultivo medida mediante el hematocrito con el tiempo (IVPCV). **B)** Producción de anticuerpos a partir de células medida mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. **C)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Las barras indican la extensión superior e inferior de los datos y la media. **D-E)** muestra la producción de anticuerpos y la intensidad de color de anticuerpos aislados de cultivos de células cultivados en CDM que contienen concentraciones variables de fuentes de hierro diferentes y concentraciones

reducidas de vitamina B. Los signos más indican condiciones con contenido bajo de vitamina y las esferas vacías indican condiciones con contenido alto de vitamina. **D)** Producción de anticuerpos a partir de células medida mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. **E)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante el ensayo de NIFTY en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja.

La **figura 7** es una serie de gráficos que muestran la intensidad de color de anticuerpos incubados en CDM que contienen concentraciones variables de sulfato ferroso o vitamina B2 en ausencia o presencia de catalasa en un experimento *in vitro*. **A)** Intensidad de color de anticuerpos en ausencia de catalasa. **B)** Intensidad de color de anticuerpos en presencia de catalasa. La intensidad de color medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Para el sulfato ferroso, -1 indica base 18 μM con alimentación 0 μM y 1 indica base 75 μM con alimentación 0 μM ; para la vitamina B2, -1 indica 0,25 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 1,41 mg/l con 10 mg/l de alimentación. La línea central indica el valor predicho calculado a partir de un modelo lineal que se deriva de los datos. Las líneas superior e inferior indican un intervalo de confianza de un 95 % de la predicción.

La **figura 8** es **A)** un gráfico que muestra una correlación entre la intensidad de color reducida y la presencia reducida de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en los medios base 3 modificados y los medios de alimentación 4 (signo más) en comparación con los medios base 1 modificados y los medios de alimentación 2 (esfera vacía). Los medios 1 modificados contenían sulfato ferroso 10 μM , 18 μM o 75 μM . Los medios 3 modificados contenían citrato férrico 10 μM o 18 μM . **B)** Un gráfico que muestra una correlación entre la intensidad de color reducida y la presencia reducida de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios que contenían sulfato ferroso 18 μM (esfera vacía) en comparación con sulfato ferroso 75 μM (signo más). **C)** Un gráfico que no muestra ninguna correlación entre la intensidad de color reducida y la presencia reducida de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios que contenían concentraciones variables de vitamina B2, B6, B9 y B12. Las concentraciones de vitamina B se variaron simultáneamente a una concentración baja (esfera vacía), una concentración media (signo más) o una concentración alta (rombo vacío). La intensidad de color medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. El porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico.

La **figura 9** es una serie de gráficos que muestran una correlación entre la intensidad de color reducida y la presencia reducida de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios que contenían concentraciones reducidas de vitamina B2 y vitamina B6. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo determinado mediante cromatografía de intercambio iónico. Para la vitamina B2, -1 indica 0,25 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 1,41 mg/l de base con 10 mg/l de alimentación; para la vitamina B6, -1 indica 5,35 mg/l de base (piridoxina) con 0 mg/l de alimentación y 1 indica piridoxina a 15,42 mg/l de base con 7 mg/l de alimentación en combinación con piridoxal a 0 mg/l de base con 60 mg/l de alimentación.

La **figura 10** es una serie de gráficos que muestran una intensidad de color reducida y una presencia reducida de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios base que contenían citrato férrico frente a sulfato ferroso con concentraciones variables de piridoxal. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo medido mediante cromatografía de intercambio iónico. Para el piridoxal, -1 indica 0 mg/l de base con 0 mg/l de alimentación y 1 indica 0 mg/l de base con 60 mg/l de alimentación. Estaban presentes citrato férrico o sulfato ferroso a 18 μM en los medios base.

La **figura 11** es una serie de gráficos que muestran una intensidad de color y concentraciones reducidas de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios base que contenían citrato férrico frente a sulfato ferroso con concentraciones variables de vitamina B2, B6, B9 y B12 en los medios de alimentación. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo medido mediante cromatografía de intercambio iónico. La concentración 1 indica los medios alimentados libres de vitamina B2, B6, B9 y B12. La concentración 2 indica los medios de alimentación que contenían 10 mg/l de vitamina B2, 7 mg/l de piridoxina, 60 mg/l de piridoxal, 197 mg/l de vitamina B9 y 48 mg/l de vitamina B12. La concentración 3 indica los medios de alimentación que contenían 5 mg/l de vitamina B2, 3,5 mg/l de piridoxina, 30 mg/l de piridoxal, 98,5 mg/l de vitamina B9 y 24 mg/l de vitamina B12. Estaban presentes citrato férrico o sulfato ferroso a 18 μM en los medios base.

La **figura 12** es una serie de gráficos que muestran una intensidad de color reducida y concentraciones reducidas de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios base que

5 contenían una concentración reducida de hierro y preferentemente con citrato férrico en lugar de sulfato ferroso como fuente de hierro. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo medido mediante cromatografía de intercambio iónico.

10 La **figura 13** es una serie de gráficos que muestran una intensidad de color reducida y concentraciones reducidas de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios base que contenían concentraciones reducidas de citrato férrico. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo medido mediante cromatografía de intercambio iónico. * Indica medios base 1 modificados para contener citrato férrico en las concentraciones indicadas. ‡ Indica medios base 3 modificados para contener citrato férrico en las concentraciones indicadas. ○ Indica soluciones de anticuerpo aisladas de células cultivadas a 33 °C. + Indica soluciones de anticuerpo aisladas de células cultivadas a 37 °C.

20 La **figura 14** es una serie de gráficos que muestran una intensidad de color reducida y concentraciones reducidas de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo obtenidas de cultivos de células cultivados en medios base que contenían concentraciones reducidas de vitamina B2, B6, B9 y B12 con la adición de cistina en lugar de cisteína y en presencia de hidrocortisona. **A)** Intensidad de color de anticuerpos aislados de células medida mediante un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. **B)** Porcentaje de variantes de carga ácidas en soluciones de anticuerpo medido mediante cromatografía de intercambio iónico. * Indica los medios base que contienen 1,41 mg/l de vitamina B2, 15,42 mg/l de piridoxina, 0 mg/l de piridoxal, 9,93 mg/l de vitamina B9 y 3,05 mg/l de vitamina B12. ‡ Indica los medios base que contienen 0,7 mg/l de vitamina B2, 7,7 mg/l de piridoxina, 0 mg/l de piridoxal, 4,9 mg/l de vitamina B9 y 1,5 mg/l de vitamina B12. ○ Indica 480 mg/l de cistina. Δ Indica 525 mg/l de cisteína. Está presente hidrocortisona a 150 nM en las soluciones indicadas.

30 La **figura 15** es una serie de gráficos que muestran la correlación entre las mediciones mediante el ensayo de color total y el ensayo de NIFTY en comparación con las mediciones mediante el ensayo de COC en cuanto a la intensidad de color. **A)** Los valores de color total y de NIFTY se representaron con los símbolos que representaban los valores de COC. **B)** Las mediciones del color mediante el ensayo de NIFTY en el conjunto de proteínas A y en la formulación de la sustancia farmacéutica correspondiente se representaron con símbolos que representaban los valores de COC. **C)** Las mediciones del color mediante el ensayo de color total en el conjunto de proteínas A y en la formulación de la sustancia farmacéutica correspondiente se representaron con símbolos que representaban los valores de COC. Las esferas vacías representan un valor de COC de ≤B3; los rombos vacíos representan un valor de COC de ≤B4 o BY4; los signos más representan un valor de COC de ≤B5 o BY5; NIFTY en SF y color total en SF indican los valores del ensayo correspondientes en la formulación de la sustancia farmacéutica final; y NIFTY en ProA y color total en ProA indican los valores del ensayo correspondientes en el conjunto de proteínas A.

40 Descripción detallada de la invención

45 Se describen medios de cultivo de células y procedimientos de uso de los medios para el crecimiento de las células (es decir, cultivo de células) y producción de polipéptidos. También se proporcionan polipéptidos, incluyendo anticuerpos, producidos mediante los procedimientos descritos. También se describen kits para preparar los medios y composiciones que comprenden los medios, así como composiciones que comprenden una célula y/o polipéptido producido mediante los procedimientos descritos. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y que tienen un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de color, opalescencia y coloración (COC). También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y que tienen un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. Se entiende que los patrones de referencia para el ensayo de COC pueden ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. 55 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y que tienen un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). En el presente documento también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y que tienen un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). También se proporcionan procedimientos de evaluación del color en una solución que contiene un polipéptido (por ejemplo, una solución que contiene un anticuerpo). En variaciones particulares, los medios, el procedimiento, los kits y las composiciones comprenden un CDM.

65 Se ha descubierto que determinados medios de cultivo de células (por ejemplo, CDM) usados en la producción de

polipéptidos proporcionan una especialidad farmacéutica de polipéptidos con atributos de calidad aceptables. Por ejemplo, se ha descubierto que determinados CDM modulan la intensidad de color de una especialidad farmacéutica de polipéptidos, con polipéptidos producidos en el CDM que proporcionan un color aceptable (por ejemplo, para su uso como una especialidad farmacéutica inyectable) mientras que mantienen los beneficios asociados con el uso de CDM. Se ha descubierto que estos CDM, cuando se usan en un procedimiento de producción de polipéptidos, disminuyen la intensidad de color de una especialidad farmacéutica de polipéptidos en comparación con el polipéptido producido en un medio diferente (por ejemplo, un medio que no comprenda los componentes en los medios y/o la cantidad de componentes como se detalla en el presente documento). Los medios de cultivo de células pueden ser químicamente definidos o químicamente indefinidos.

Sin pretender vincularse a ninguna teoría, se cree que el uso de componentes en el medio particulares (tales como cistina y/o cisteína, determinadas vitaminas B, hidrocortisona y/o una fuente de hierro) a determinadas concentraciones produce una especialidad farmacéutica de polipéptidos con atributos de calidad aceptables, y con un color aceptable en particular. Aunque se cree que el uso de estos componentes en el medio en el medio base usado para el crecimiento de las células, en particular, es influyente en los atributos de calidad de una especialidad farmacéutica de polipéptidos, se contempla que se puedan emplear los medios como se proporciona en el presente documento en cualquier etapa del procedimiento de crecimiento de las células, mantenimiento y producción de polipéptidos, incluyendo en los medios base y de alimentación. Los medios proporcionados en el presente documento se pueden usar en procedimientos de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) y en la producción de un polipéptido, y pueden encontrar uso en la fase de crecimiento, mantenimiento y/o producción de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido deseado. Los medios descritos en el presente documento se pueden emplear para proporcionar mejoras en una o más propiedades de una especialidad farmacéutica de polipéptidos (por ejemplo, color, composición, pureza, etc.) o uno o más aspectos de un procedimiento de producción del polipéptido (por ejemplo, reproducibilidad de lote a lote, facilidad de fabricación, coste de fabricación, etc.). Se describen polipéptidos (por ejemplo, un anticuerpo) producidos mediante un procedimiento de cultivo de células que emplea el medio proporcionado en el presente documento. En un aspecto, el polipéptido está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y con un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En otro aspecto, el polipéptido está a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y con un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. También se describen procedimientos de administración de productos de polipéptidos detallados en el presente documento, así como artículos de fabricación que comprenden los productos de polipéptidos como se producen en el presente documento.

Definiciones

Para su uso en el presente documento, a menos que se indique claramente de otro modo, el uso de los términos "un", "uno" y similares se refiere a uno o más.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Una "variante de carga" es una variante de la proteína de la especie principal (por ejemplo, anticuerpo) que tiene una carga diferente que la de la proteína de la especie principal.

Una "variante de carga ácida" es una variante de la proteína de la especie principal (por ejemplo, anticuerpo) que es más ácida que la proteína de la especie principal (por ejemplo, anticuerpo). Una variante ácida ha ganado carga negativa o ha perdido carga positiva en relación con la proteína de la especie principal (por ejemplo, anticuerpo). Dichas variantes de carga ácidas se pueden separar usando una metodología de separación, tal como cromatografía de intercambio iónico, que separa las proteínas de acuerdo con la carga.

El término "proteína de la especie principal" en el presente documento se refiere a la estructura de la secuencia de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, anticuerpo) en una composición que es la molécula de proteína (por ejemplo, anticuerpo) cuantitativamente predominante en la composición.

"Cultivar" una célula se refiere a poner en contacto una célula con un medio de cultivo de células en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o crecimiento de la célula.

Un "cultivo por lotes" se refiere a un cultivo en el que todos los componentes para el cultivo de células (incluyendo las células y todos los nutrientes de cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del procedimiento de cultivo.

La frase "cultivo de células por lotes alimentados", como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo por

lotes en el que las células y el medio de cultivo se suministran inicialmente al recipiente de cultivo, y se alimentan, continuamente o en incrementos discretos, nutrientes de cultivo adicionales al cultivo durante el procedimiento de cultivo, con o sin obtención periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo.

5 Un "cultivo por perfusión" es un cultivo mediante el que las células se restringen en el cultivo, por ejemplo, mediante filtración, encapsulación, anclaje a microtransportadores, etc., y el medio de cultivo se introduce y elimina continua o intermitentemente del recipiente de cultivo.

10 "Recipiente de cultivo" se refiere a un envase usado para cultivar una célula. El recipiente de cultivo puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células.

15 "Valor": El término "valor" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de polipéptido expresado de forma recombinante producido por un cultivo de células dividida entre una cantidad dada de volumen del medio. El valor se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido por mililitro de medio.

20 Los términos "medio" y "medio de cultivo de células" se refieren a una fuente de nutrientes usada para cultivar o mantener las células. Como se entiende por un experto en la técnica, la fuente de nutrientes puede contener componentes requeridos por la célula para su crecimiento y/o supervivencia o puede contener componentes que contribuyan al crecimiento y/o supervivencia de las células. Las vitaminas, los aminoácidos esenciales o no esenciales y los oligoelementos son ejemplos de componentes en el medio.

25 Un "medio de cultivo de células químicamente definido" o "CDM" es un medio con una composición específica que está libre de productos derivados de animal, tales como suero y peptona animales. Los términos también engloban un medio con una composición específica que está libre de componentes indefinidos o parcialmente definidos, por ejemplo, componentes tales como un suero animal, una peptona animal y una peptona vegetal. Como se entendería por un experto en la técnica, se puede usar un CDM en un procedimiento de producción de polipéptidos, con lo que una célula está en contacto con, y segrega un polipéptido en, el CDM. Por tanto, se entiende que una composición puede contener un CDM y un producto de polipéptidos y que la presencia del producto de polipéptidos no hace que el CDM sea químicamente indefinido.

30 Un "medio de cultivo de células químicamente indefinido" se refiere a un medio cuya composición química no se puede especificar y que puede contener uno o más productos derivados de animal, tales como suero y peptona animales. Como se entendería por un experto en la técnica, un medio de cultivo de células químicamente indefinido puede contener un producto derivado de animal como fuente de nutrientes. El término también puede englobar un medio de cultivo de células que comprende componentes indefinidos o parcialmente indefinidos, por ejemplo, componentes tales como un suero animal, una peptona animal y una peptona vegetal.

35 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y se puede interrumpir por moléculas distintas a aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se haya modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los ejemplos de polipéptidos englobados en la definición en el presente documento incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana, o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinas; RANTES (regulación en función de la activación, expresada y segregada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-b; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento (IGFBP); proteínas CD, tales como CD3, CD4, CDS, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores

estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adresasinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VEA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2, HER3 o HER4; inmunoadhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a una proteína, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.

5
10 Un "polipéptido aislado" significa un polipéptido que se ha recuperado de una célula o cultivo de células a partir de los que se expresó.

15 "Ácido nucleico", como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, se puede conferir una modificación a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero.

20 Un "ácido nucleico aislado" significa y engloba una secuencia no natural, recombinante o una natural fuera de o separada de su contexto habitual.

25 Un polipéptido "purificado" significa que el polipéptido se ha incrementado en pureza, de tal manera que exista en una forma que sea más pura de la que existe en su entorno natural y/o cuando inicialmente se produce y/o sintetiza y/o amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

30 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo.

35 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general, la región variable o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; moléculas de anticuerpo monocatenario; diacuerpos; anticuerpos lineales; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

40 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos frente a determinantes (epítotos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar mediante el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.* Nature 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 4.816.567). También se pueden aislar los "anticuerpos monoclonales" de colecciones de anticuerpos en fago usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson *et al.* Nature 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

55 Los anticuerpos "humanizados" son formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) que son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se realizan estas modificaciones para refinar además el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominio(s) variable(s) en el/los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Stmct. Biol. 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, no más de aproximadamente 1×10^{-8} o no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

"Contaminantes" se refiere a materiales que son diferentes del producto de polipéptidos deseados. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula huésped, tales como CHOP; proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componentes en los medios de cultivo de células, etc.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

Un líquido "incolore o ligeramente coloreado" se refiere a una composición líquida que comprende un polipéptido que se mide mediante análisis cuantitativo y/o cualitativo. El análisis cualitativo incluye la inspección visual, tal como la comparación de la composición que comprende el polipéptido con respecto a un patrón de referencia.

Se entiende que siempre que se describan modos de realización en el presente documento con la expresión "que comprende" también se proporcionan modos de realización de otro modo análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Si los aspectos o modos de realización de la divulgación se describen en términos de un grupo de Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente divulgación no solo engloba todo el grupo enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, sino también el grupo principal ausente con uno o más de los miembros del grupo. La presente divulgación también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la divulgación reivindicada.

Medio de cultivo de células

Los medios de cultivo de células proporcionados en el presente documento pueden encontrar uso en los procedimientos (por ejemplo, de cultivo de células (es decir, de cultivar células) y producción de polipéptidos) y en las composiciones como se detalla en el presente documento. Se han identificado componentes en los medios como que pueden proporcionar una especialidad farmacéutica de polipéptidos con atributos de calidad aceptables, tales como un color aceptable (por ejemplo, para uso como una especialidad farmacéutica inyectable). Determinados componentes en los medios reducen la intensidad de color de una especialidad farmacéutica de polipéptidos en comparación con el polipéptido producido en medios diferentes, lo que puede ser significativo en particular para los productos de polipéptidos que se formulan en concentraciones mayores de cualquiera de 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml. En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos está a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). En algunos aspectos, una especialidad farmacéutica de polipéptidos está a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). Los medios de cultivo de células adecuados se detallan por todo el documento, incluyendo en el breve sumario de la invención y en otras partes. Se puede emplear cualquier medio detallado en el presente documento en cualquier etapa del crecimiento de las células, mantenimiento y producción de polipéptidos y se puede usar en el medio base y/o en el medio de alimentación. Los medios como se describen en el presente documento en una variación dan como resultado una viabilidad de las células y niveles de valores de anticuerpos aceptables, y una intensidad de color

aceptable de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) aislado de un cultivo de células cultivado en los medios.

Se proporciona un medio de cultivo de células que comprende uno o más de los siguientes componentes: (a) cistina y/o cisteína; (b) vitamina B2, (c) vitamina B6 (piridoxina y/o piridoxal), (d) vitamina B9, (e) vitamina B12, (f) una fuente de hierro, tal como citrato férrico y (g) hidrocortisona. En una variación, un medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g). Se entiende que un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento puede contener cualquier combinación de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g), igual que si todas y cada una de las combinaciones se enumerara específica e individualmente. Por ejemplo, se entiende que un medio de cultivo de células que comprende cuatro de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) puede comprender cualquier combinación de los componentes siempre que estén presentes al menos cuatro de los componentes. En un aspecto, el medio de cultivo de células es un CDM. En otro aspecto, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.

Se pueden añadir componentes en los medios a una composición en formas que se conozcan en la técnica. Por ejemplo, se puede proporcionar vitamina B2 como riboflavina en polvo, se puede proporcionar vitamina B6 como piridoxina HCl o como piridoxal HCl, se puede proporcionar vitamina B9 como ácido fólico en polvo, se puede proporcionar vitamina B12 como cianocobalamina en polvo, se puede proporcionar cisteína como monohidrato de L-cisteína en polvo, se puede proporcionar cistina como sal disódica monohidratada en polvo. En algunos modos de realización, no se proporciona la vitamina B6 como piridoxal HCl. En un ejemplo no limitante adicional, se puede proporcionar vitamina B1 como monohidrato de tiamina, se puede proporcionar vitamina B3 como niacinamida, se puede proporcionar vitamina B5 como D-pantotenato de calcio y se puede proporcionar vitamina B7 como biotina. Como otro ejemplo no limitante, se puede añadir hierro en formas de hierro o fuentes de hierro diferentes. En algunos modos de realización, una fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso. Se pueden proporcionar los componentes en los medios descritos en el presente documento en forma de una sal, un hidrato, una sal hidratada, o como una solución, un extracto o en forma sólida.

En una variación, el medio comprende cistina y cada una de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. En una variación, el medio comprende cistina, vitaminas B2, B6, B9, B12 y una fuente de hierro, tal como citrato férrico. En otra variación, el medio comprende cada una de cistina, vitaminas B2, B6, B9, B12, una fuente de hierro, tal como citrato férrico, e hidrocortisona. En otra variación, el medio comprende cistina, hidrocortisona y una fuente de hierro, tal como citrato férrico. Todavía en otra variación, el medio comprende cistina, hidrocortisona, una fuente de hierro, tal como citrato férrico, y al menos una de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. Todavía en otra variación, el medio comprende cistina, hidrocortisona, una fuente de hierro, tal como citrato férrico, y al menos dos de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. Todavía en otra variación, el medio comprende cistina, hidrocortisona, una fuente de hierro, tal como citrato férrico, y al menos tres de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. En cualquier medio descrito en el presente documento, en un aspecto el medio es un CDM. En un aspecto, un medio de cultivo de células comprende cisteína. En otra variación, un medio de cultivo de células comprende tanto cistina como cisteína.

En una variación, los medios son un medio de cultivo de células que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12. En una variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,50 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,40 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,30 mg/l. En una variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En una variación, el medio de cultivo de células comprende además una fuente de hierro. En una variación, la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso. En una variación, el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona. En una variación, la hidrocortisona está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM.

En otra variación, el medio de cultivo de células comprende una o más de las siguientes: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina y/o cisteína (y que en un aspecto es cistina); (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina); (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; (f) de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM de una fuente de hierro, tal como nitrato, citrato o sulfato de hierro (que en un aspecto es citrato férrico y/o sulfato ferroso); y (g) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM. En otra variación, el medio de cultivo de células comprende una o más de las siguientes: (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 600 mg/l de cistina y/o cisteína (y que en un aspecto es cistina); (b) de aproximadamente

0,05 mg/l a aproximadamente 0,5 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 2,0 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l de vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina); (d) de aproximadamente 4,0 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 mg/l de vitamina B12; (f) de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 25 μ M de una fuente de hierro, tal como nitrato, citrato o sulfato de hierro (que en un aspecto es citrato y/o sulfato férrico); y (g) hidrocortisona de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 0,2 μ M. Aún en otra variación, el medio de cultivo de células comprende una o más de las siguientes: (a) de aproximadamente 400 mg/l a aproximadamente 500 mg/l de cistina y/o cisteína (y que en un aspecto es cistina); (b) de aproximadamente 0,1 mg/l a aproximadamente 0,3 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 4,0 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l de vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina); (d) de aproximadamente 7,0 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 mg/l de vitamina B12; (f) de aproximadamente 12 μ M a aproximadamente 20 μ M de una fuente de hierro, tal como nitrato, citrato o sulfato de hierro (que en un aspecto es citrato y/o sulfato férrico); y (g) hidrocortisona de aproximadamente 0,125 μ M a aproximadamente 0,175 μ M. En una variación, un medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) en las concentraciones citadas en el presente documento. Se entiende que un medio de cultivo de células puede contener cualquier combinación de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) en los intervalos de concentración proporcionados en el presente documento, igual que si todas y cada una de las combinaciones se enumerara específica e individualmente. Por ejemplo, se entiende que el medio en una variación comprende los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) y puede comprender opcionalmente los componentes (f) y/o (g). También se entiende que en otra variación, el medio comprende los componentes (a), (f) y (g) y puede comprender opcionalmente uno cualquiera o más de los componentes (b), (c), (d) y (e). En cualquier variación en la que el medio comprende cistina o cisteína, en un aspecto el medio comprende cistina (y en otra variación está libre de cisteína). En cualquier variación en la que el medio comprende vitamina B6, en un aspecto el medio comprende piridoxano. En cualquier variación en la que el medio comprende una fuente de hierro, en un aspecto la fuente de hierro es citrato férrico. Por tanto, se entiende que, en determinadas variaciones, un medio comprende cistina, piridoxano y citrato férrico. En un aspecto, el medio de cultivo de células es un CDM.

En una variación, el medio comprende (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12. En una variación, el medio comprende (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; y (f) de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso. En otra variación, el medio comprende cada una de (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; (f) de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso; y (g) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M. En otra variación, el medio comprende: de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso; e hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M. Todavía en otra variación, el medio comprende: de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso; hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M, y al menos una o dos o tres de: de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12. En cualquier medio descrito en el presente documento, en un aspecto el medio es un CDM. En cualquier medio descrito en el presente documento, en un aspecto el medio es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.

En algunas otras variaciones, el medio de cultivo de células comprende además cisteína en las cantidades como se describe en la tabla 1. Por ejemplo, se entiende que un medio de cultivo de células que comprende (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 puede comprender además de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína. En una variación, en un medio de cultivo de células que comprende (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; y (f) de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M de una fuente de hierro, tal como

ES 2 716 301 T3

5 citrato férrico o sulfato ferroso, puede comprender además de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína. En algunas variaciones, un medio de cultivo de células que comprende (a) de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; (b) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; (c) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; (d) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; (e) de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; (f) de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso; y (g) hidrocortisona de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM puede comprender además de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína. Aún en otra variación, un medio de cultivo de células que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM de una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso; hidrocortisona de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM, y al menos una o dos o tres de: de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 puede comprender además de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína.

Los componentes en los medios individuales pueden estar presentes en cantidades que den como resultado una o más propiedades ventajosas (tales como uno o más atributos de calidad del producto aceptables). En una variación, un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento contiene componentes en los medios en las cantidades como se describe en la tabla 1. Se entiende que un medio puede comprender uno cualquiera o más de los componentes en el medio de la tabla 1 (por ejemplo, uno cualquiera o más de los componentes (a)-(g), tal como un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) o un medio que comprende los componentes (a), (f) y (g) o un medio que comprende cada uno de los componentes (a)-(g)) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1, igual que si todas y cada una de las combinaciones de componentes y cantidades se enumerara específica e individualmente. En una variación particular, el medio es un CDM. En otra variación particular, el medio es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. Un medio proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un CDM), en una variación, comprende piridoxina y está libre de piridoxal. Se puede emplear un medio libre de piridoxal en el medio base y/o en el medio de alimentación. En una variación, el medio base está libre de piridoxal y comprende piridoxina.

Tabla 1. Cantidades ejemplares de componentes en los medios

Componente en los medios	Cantidad de componente en el medio
(a) Cistina y/o cisteína (que en una variación es cistina)	de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 100 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1400 mg/l; de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1300 mg/l; de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 1100 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 1000 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 900 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 800 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 700 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 600 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 500 mg/l; de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 400 mg/l; de aproximadamente 400 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 500 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 600 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 700 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l; de aproximadamente 400 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 500 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 600 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 700 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 800 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 900 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 1000 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 1100 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 1200 mg/l; de aproximadamente 350 mg/l a aproximadamente 850 mg/l; de aproximadamente 400 mg/l a aproximadamente 800 mg/l; de aproximadamente 450 mg/l a aproximadamente 550 mg/l; de aproximadamente 450 mg/l a aproximadamente 500 mg/l; aproximadamente cualquiera de 80 u 81 u 82 u 83 u 84 u 85 u 86 u 87 u 88 u 90 o 100 o 120 o 140 o 160 o 180 o 200 o 210 o 220 o 230 o 240 o 250 o 260 o 270 o 280 o 290 o 300 o 350 o 375 o 400 o 425 o 450 o 475 o 500 o 525 o 550 o 575 o 600 o 625 o 650 o 675 o 700 o 725 o 750 o 765 o 775 o 785 o 795 u 800 u 825 u 850 u 875 o 900 o 925 o 950 o 975 o 1000 o 1050 o 1100 o 1150 o 1200 o 1250 o 1300 o 1350 o 1400 o 1450 o 1500 mg/l; al menos aproximadamente cualquiera de 80 u 81 u 82 u 83 u 84 u 85 u 86 u 87 u 88 u 90 o 100 o 120 o 140 o 160 o 180 o 200 o 210 o 220 o 230 o 240 o 250 o 260 o 270 o 280 o 290 o 300 o 350 o 375 o 400 o 425 o 450 o 475 o 500 o 525 o 550 o 575 o 600 o 625 o 650 o 675 o 700 o 725 o 750 o 765 o 775 o 785 o 795 u 800 u 825 u 850 u 875 o 900 o 925 o 950 o 975 o 1000 o 1050 o 1100 o 1150 o 1200 o 1250 o 1300 o

ES 2 716 301 T3

	aproximadamente 12,0 mg/l; de aproximadamente 5,0 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l; de aproximadamente 5,5 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l; de aproximadamente 6,0 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l; de aproximadamente 7,0 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l; de aproximadamente 8,0 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l; de aproximadamente 3,0 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l; de aproximadamente 4,0 mg/l a aproximadamente 9,0 mg/l; de aproximadamente 7,0 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l; aproximadamente cualquiera de 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 4,5 o 5,0 o 5,5 o 6,0 o 6,5 o 7,0 o 7,5 u 8 u 8,5 o 9,0 o 9,5 o 10 mg/l; al menos aproximadamente cualquiera de 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 6,0 o 7,0 u 8,0 mg/l y no más de 12,0 o 10,0 o 9,0 mg/l.
(e) vitamina B12	de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,25 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,0 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,75 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,25 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,75 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/l; de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,25 mg/l; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 1,75 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 2,25 a aproximadamente 2,5 mg/l; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 mg/l; de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 mg/l; de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 2,0 mg/l; de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,25 mg/l; de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 2,0 mg/l; aproximadamente cualquiera de 0,5 o 1,0 o 1,25 o 1,5 o 1,75 o 2,0 o 2,25 a aproximadamente 2,5 mg/l; al menos aproximadamente cualquiera de 0,5 o 1,0 o 1,25 o 1,5 y no más de 2,25 o 2,0 o 1,75 mg/l.
(f) una fuente de hierro, tal como citrato férrico	de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 15 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 20 µM; aproximadamente cualquiera de 5 o 10 o 15 o 20 o 25 o 30 o 35 o 40 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 2 o 5 o 10 o 12,5 o 15 o 17,5 y no más de aproximadamente 30 o 25 o 20 µM.
(g) hidrocortisona	de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM; de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,2 µM; de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,15 µM; de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,1 µM; de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,075 µM; de aproximadamente 0,075 µM a aproximadamente 0,25 µM; de aproximadamente 0,1 µM a aproximadamente 0,25 µM; de aproximadamente 0,15 µM a aproximadamente 0,25 µM; de aproximadamente 0,2 µM a aproximadamente 0,25 µM; de aproximadamente 0,1 µM a aproximadamente 0,2 µM; de aproximadamente 0,125 µM a aproximadamente 0,225 µM; de aproximadamente 0,125 µM a aproximadamente 0,2 µM; de aproximadamente 0,15 µM a aproximadamente 0,175 µM; aproximadamente cualquiera de 0,05 o 0,1 o 0,125 o 0,15 o 0,175 o 0,2 o 0,22 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,05 o 0,1 o 0,125 y no más de 0,2 o 0,175 µM.

En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona un medio de cultivo de células que comprende uno o más de los siguientes componentes seleccionados del grupo que consiste en: (a) vitamina B1; (b) vitamina B2; (c) vitamina B3; (d) vitamina B5; (e) vitamina B6; (f) vitamina B7; (g) vitamina B9; (h) vitamina B12; (i) una fuente de hierro, tal como citrato férrico; y (j) cistina. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) y (j). Se entiende que el medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento puede contener cualquier combinación de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) y (j), igual que si todas y cada una de las combinaciones se enumerara específica e individualmente. Por ejemplo, se entiende que un medio de cultivo de células que comprende ocho de los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h) puede comprender cualquier combinación de los componentes siempre que estén presentes al menos ocho de los componentes. En algunos modos

ES 2 716 301 T3

de realización, un cultivo de células proporcionado en el presente documento comprende los componentes (b), (e), (g), (h) y (j). En algunos modos de realización en el presente documento, un cultivo de células proporcionado en el presente documento que comprende los componentes (b), (e), (g), (h) y (j) comprende además (a), (c), (d) y (f). En algunos modos de realización en el presente documento, un cultivo de células proporcionado en el presente documento que comprende los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) y (j) comprende además (i).

En algunos aspectos, un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento contiene uno o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en (a) vitamina B1; (b) vitamina B2; (c) vitamina B3; (d) vitamina B5; (e) vitamina B6; (f) vitamina B7; (g) vitamina B9; (h) vitamina B12; (i) una fuente de hierro, tal como citrato férrico; y (j) cistina en las cantidades como se describe en la tabla 1A. Se entiende que un medio puede comprender uno cualquiera o más de los componentes en el medio de la tabla 1A (por ejemplo, uno cualquiera o más de los componentes (a)-(j)), tal como un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) o un medio que comprende los componentes (b), (e), (g), (h) y (j) o un medio que comprende solo uno de los componentes (a)-(j) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1A, igual que si todas y cada una de las combinaciones de componentes y cantidades se enumerara específica e individualmente. En algunos aspectos, un medio de cultivo de células comprende los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i), en el que (a) es vitamina B1 de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 14 μM , (b) es vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM , (c) es vitamina B3 de aproximadamente 11 μM a aproximadamente 72 μM , (d) es vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44 μM , (e) es vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30 μM , (f) es vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,14 μM , (g) es vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22 μM , (h) es vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , (i) es citrato férrico de aproximadamente 11 μM a aproximadamente 36 μM , y (j) es cistina de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,5 mM.

En algunos otros aspectos, el medio de cultivo de células comprende además cisteína en las cantidades como se describe en la tabla 1A. Por ejemplo, se entiende que un medio de cultivo de células que comprende (a) vitamina B1 de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 14 μM , (b) vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM , (c) vitamina B3 de aproximadamente 11 μM a aproximadamente 72 μM , (d) vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44 μM , (e) vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30 μM , (f) vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,14 μM , (g) vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22 μM , (h) vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , (i) citrato férrico de aproximadamente 11 μM a aproximadamente 36 μM , y (j) cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,0 mM puede comprender además (k) cisteína de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM.

Tabla 1A. Cantidades ejemplares de componentes en los medios

Componente	Cantidad de componente en el medio
(a) Vitamina B1	de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 16 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 14 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 12 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 8 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 6 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 4 μM ; de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 2 μM ; de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 8 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 12 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 14 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 16 μM a aproximadamente 18 μM ; de aproximadamente 1,5 μM a aproximadamente 16 μM ; de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 14 μM ; de aproximadamente 2,5 μM a aproximadamente 12 μM ; de aproximadamente 3 μM a aproximadamente 10 μM ; de aproximadamente 3,5 μM a aproximadamente 8 μM ; de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 6 μM ; aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 4 o 6 u 8 o 10 o 12 o 14 μM ; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 4 o 6 μM y no más de aproximadamente 14 o 12 o 10 μM .
(b) Vitamina B2	de aproximadamente 0,09 μM a aproximadamente 0,8 μM ; de aproximadamente 0,09 μM a aproximadamente 0,6 μM ; de aproximadamente 0,09 μM a aproximadamente 0,4 μM ; de aproximadamente 0,09 μM a aproximadamente 0,2 μM ; de aproximadamente 0,09 μM a aproximadamente 0,1 μM ; de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 0,8 μM ; de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 0,8 μM ; de aproximadamente 0,4 μM a aproximadamente 0,8 μM ; de aproximadamente 0,6 μM a aproximadamente 0,8 μM ; de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 0,7 μM ; de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 0,6 μM ; de aproximadamente 0,3 μM a aproximadamente 0,5 μM ; de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 0,76 μM ; de aproximadamente 0,11 μM a

ES 2 716 301 T3

	aproximadamente 0,72 µM; de aproximadamente 0,12 µM a aproximadamente 0,68 µM; de aproximadamente 0,13 µM a aproximadamente 0,64 µM; de aproximadamente 0,14 µM a aproximadamente 0,6 µM; aproximadamente cualquiera de 0,1 o 0,2 o 0,3 o 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,1 o 0,2 o 0,3 µM y no más de aproximadamente 0,8 o 0,7 o 0,6 µM.
(c) Vitamina B3	de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 80 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 70 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 60 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 8,5 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 60 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 70 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 80 µM a aproximadamente 86 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 80 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 70 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 60 µM; de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 9,5 µM a aproximadamente 80 µM; de aproximadamente 11 µM a aproximadamente 72 µM; de aproximadamente 12,5 µM a aproximadamente 64 µM; de aproximadamente 14 µM a aproximadamente 56 µM; aproximadamente cualquiera de 10 u 11 o 15 o 20 o 30 o 40 o 50 o 60 o 70 o 72 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 9 o 10 u 11 o 12 o 13 µM y no más de aproximadamente 80 o 75 o 72 o 65 µM.
(d) Vitamina B5	de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 5,4 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 54 µM; de aproximadamente 6 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 7 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 8 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 9 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 6,1 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 6,2 µM a aproximadamente 49 µM; de aproximadamente 6,3 µM a aproximadamente 48 µM; de aproximadamente 6,4 µM a aproximadamente 47 µM; de aproximadamente 6,5 µM a aproximadamente 46 µM; de aproximadamente 6,6 µM a aproximadamente 45 µM; de aproximadamente 6,8 µM a aproximadamente 44 µM; aproximadamente cualquiera de 6 o 6,8 o 10 o 20 o 30 o 40 o 44 o 50 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 6 o 6,8 o 7 u 8 o 9 o 10 µM y no más de aproximadamente 50 o 44 o 40 o 35 µM.
(e) Vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina)	de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 15 µM; de aproximadamente 4,0 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 32 µM; de aproximadamente 5,0 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 4,5 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 5,0 µM a aproximadamente 28 µM; de aproximadamente 5,5 µM a aproximadamente 26 µM; aproximadamente cualquiera de 4,0 o 4,5 o 5,0 o 10 o 15 o 20 o 30 o 32 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 4,0 o 4,5 o 5,0 o 6,0 µM y no más de aproximadamente 32 o 30 o 28 µM.
(f) Vitamina B7	de aproximadamente 0,016 µM a aproximadamente 0,18 µM; de aproximadamente 0,016 µM a aproximadamente 0,15 µM; de aproximadamente 0,016 µM a aproximadamente 0,10 µM; de aproximadamente 0,016 µM a aproximadamente 0,05 µM; de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,18 µM; de aproximadamente 0,10 µM a aproximadamente 0,18 µM; de aproximadamente 0,15 µM a aproximadamente 0,18 µM; de aproximadamente 0,018 µM a aproximadamente 0,16 µM; de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 0,14 µM; de aproximadamente 0,022 µM a aproximadamente 0,12 µM; de aproximadamente 0,024 µM a aproximadamente 0,10 µM; de aproximadamente 0,026 µM a aproximadamente 0,08 µM; de aproximadamente 0,028 µM a aproximadamente 0,06 µM; de aproximadamente 0,030 µM a

ES 2 716 301 T3

	aproximadamente 0,04 µM; aproximadamente cualquiera de 0,016 o 0,018 o 0,02 o 0,05 o 0,10 o 0,12 o 0,14 o 0,16 o 0,18 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,016 o 0,018 o 0,02 o 0,025 µM y no más de aproximadamente 0,18 o 0,16 o 0,14 o 0,12 µM.
(g) Vitamina B9	de aproximadamente 3,0 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 3,0 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 3,0 µM a aproximadamente 15 µM; de aproximadamente 3,0 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 3,0 µM a aproximadamente 5,0 µM; de aproximadamente 5,0 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 5,0 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 15 µM; de aproximadamente 3,4 µM a aproximadamente 22 µM; de aproximadamente 3,8 µM a aproximadamente 19 µM; de aproximadamente 4,2 µM a aproximadamente 16 µM; aproximadamente cualquiera de 3,0 o 3,4 o 4,0 o 5,0 o 10 o 15 o 20 o 22 o 25 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 3 o 3,4 o 4,0 o 5,0 µM y no más de aproximadamente 25 o 22 o 22 µM.
(h) Vitamina B12	de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 1,75 µM; de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 1,5 µM; de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 1,25 µM; de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 1,0 µM; de aproximadamente 0,18 µM a aproximadamente 0,5 µM; de aproximadamente 0,25 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 0,5 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 0,75 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 1,25 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 1,5 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 1,75 µM a aproximadamente 2,0 µM; de aproximadamente 0,25 µM a aproximadamente 1,75 µM; de aproximadamente 0,5 µM a aproximadamente 1,5 µM; de aproximadamente 0,75 µM a aproximadamente 1,25 µM; de aproximadamente 0,2 µM a aproximadamente 1,5 µM; de aproximadamente 0,4 µM a aproximadamente 1,0 µM; aproximadamente cualquiera de 0,18 o 0,2 o 0,5 o 1,0 o 1,5 o 2,0 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,18 o 0,2 o 0,4 µM y no más de aproximadamente 2,0 o 1,75 o 1,5 o 1,25 µM.
(i) una fuente de hierro, tal como citrato férrico	de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 20 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 15 µM; de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 10 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 30 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 40 µM a aproximadamente 50 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 40 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 30 µM; de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 25 µM; de aproximadamente 15 µM a aproximadamente 20 µM; aproximadamente cualquiera de 5 o 10 o 15 o 20 o 25 o 30 o 35 o 40 µM; al menos aproximadamente cualquiera de 2 o 5 o 10 o 12,5 o 15 o 17,5 y no más de aproximadamente 30 o 25 o 20 µM.
(j) Cistina	de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,25 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,75 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,25 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,0 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 1,6 mM; de aproximadamente 1,2 mM a aproximadamente 1,4 mM; de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 2,25 mM a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,75 mM; de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 1,25 mM; aproximadamente cualquiera de 0,7 o 0,8 o 0,9 o 1,0 o 1,1 o 1,2 o 1,3 o 1,4 o 1,5 o 1,6 mM; cualquiera de 0,7 mM, 0,75 mM, 0,8 mM, 0,85 mM, 0,9 mM, 0,95 mM, 1,0 mM, 1,05 mM, 1,1 mM, 1,15 mM, 1,2 mM, 1,25 mM, 1,3 mM, 1,35 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,55 mM, 1,6 mM, 1,65 mM, 1,7 mM, 1,75 mM, 1,8 mM, 1,85 mM, 1,9 mM o 1,95 mM o 2,0 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,7 o 0,8 o 0,9 o 1,0 o 1,1 mM y no más de aproximadamente

	2,0 o 1,75 o 1,6 o 1,5 o 1,4 mM.
(k) Cisteína	de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,75 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,25 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,0 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 0,75 mM; de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 2,0 mM; de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 2,0 mM; aproximadamente cualquiera de 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8 o 0,9 o 1,0 o 1,1 o 1,2 o 1,3 o 1,4 o 1,5 o 1,6 o 1,7 o 1,8 o 1,9 o 2,0 mM; cualquiera de 0,5 mM, 0,55 mM, 0,6 mM, 0,65 mM, 0,7 mM, 0,75 mM, 0,8 mM, 0,85 mM, 0,9 mM, 0,95 mM, 1,0 mM, 1,05 mM, 1,1 mM, 1,15 mM, 1,2 mM, 1,25 mM, 1,3 mM, 1,35 mM, 1,4 mM, 1,5 mM, 1,55 mM, 1,6 mM, 1,65 mM, 1,7 mM, 1,75 mM, 1,8 mM, 1,85 mM, 1,9 mM, 1,95 mM, o 2,0 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,5 o 0,6 o 0,7 o 0,8 o 0,9 o 1,0 o 1,1 mM y no más de aproximadamente 2,0 o 1,8 o 1,75 o 1,6 o 1,5 o 1,4 mM.

Un medio proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un CDM o un medio químicamente indefinido), en una variación, comprende cistina y está libre de cisteína. Se puede emplear un medio libre de cisteína en el medio base o en el medio de alimentación. En una variación, el medio base está libre de cisteína y comprende cistina. En una variación, un medio base que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina); de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12, que en un aspecto puede comprender además una cualquiera o más de: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 µM a aproximadamente 14,0 µM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 µM a aproximadamente 72,0 µM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 µM a aproximadamente 44,0 µM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 0,24 µM) está libre de cisteína. En otra variación, un medio base que comprende cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos modos de realización, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; vitamina B2 de aproximadamente 0,11 µM a aproximadamente 0,72 µM; vitamina B6 de aproximadamente 4,5 µM a aproximadamente 30 µM (que en un aspecto es piridoxina); vitamina B9 de aproximadamente 3,4 µM a aproximadamente 22 µM; y vitamina B12 de aproximadamente 0,2 µM a aproximadamente 1,5 µM, que en un aspecto puede comprender además una cualquiera o más de: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 µM a aproximadamente 14,0 µM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 µM a aproximadamente 72,0 µM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 µM a aproximadamente 44,0 µM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 0,24 µM) está libre de cisteína. En cualquier variación en el presente documento, el medio base puede comprender además una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 11,0 µM a aproximadamente 36,0 µM). En cualquier variación en el presente documento, los medios base pueden comprender además hidrocortisona (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,5 µM).

Un medio proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un CDM o un medio químicamente indefinido), en una variación, comprende cisteína y está libre de cistina. Se puede emplear un medio libre de cistina en el medio base o en el medio de alimentación. En una variación, el medio de alimentación está libre de cistina y comprende cisteína. En una variación, un medio de alimentación comprende de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína. En otra variación, un medio de alimentación comprende cisteína de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM. Por ejemplo, un medio base que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos aspectos, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2; de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 (que en un aspecto es piridoxina); de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12, que en un aspecto puede comprender además una cualquiera o más de: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 µM a aproximadamente 14,0 µM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 µM a aproximadamente 72,0 µM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 µM a aproximadamente 44,0 µM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 0,24 µM) se puede enriquecer con un medio de alimentación que comprende de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína (en algunos aspectos, cisteína 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM). En otra variación, un medio base que comprende cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos aspectos, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; vitamina B2 de aproximadamente 0,11 µM a aproximadamente 0,72 µM; vitamina B6 de aproximadamente 4,5 µM a

aproximadamente 30 μM (que en un aspecto es piridoxina); vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22 μM ; y vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM , que en un aspecto puede comprender además una cualquiera o más de: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM) se puede enriquecer con un medio de alimentación que comprende de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína (en algunos aspectos, cisteína 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM). En cualquier variación en el presente documento, el medio base puede comprender además una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM). En cualquier variación en el presente documento, los medios base pueden comprender además hidrocortisona (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM).

Un medio proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un CDM o un medio químicamente indefinido), en una variación, comprende citrato férrico y está libre de sulfato ferroso. Se puede emplear un medio libre de sulfato ferroso en el medio base o en el medio de alimentación. En una variación, el medio base está libre de sulfato ferroso y comprende citrato férrico.

En una variación particular, un medio proporcionado en el presente documento está libre de cisteína y sulfato ferroso. En una de dichas variaciones, el medio está libre de cisteína y sulfato ferroso y comprende cistina y/o citrato férrico.

Un medio proporcionado en el presente documento, en una variación, está libre de hidrocortisona. En otra variación, un medio comprende hidrocortisona. En un aspecto, el medio comprende hidrocortisona y está libre de cisteína y/o sulfato ferroso. En otro aspecto, el medio comprende hidrocortisona y cistina y citrato férrico. En una variación particular, el medio que comprende hidrocortisona es el medio base. En una variación, un medio base comprende cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos aspectos, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM; citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM , y donde el medio base puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B2 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l); (2) vitamina B6 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l); (3) vitamina B9 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l); y (4) vitamina B12 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l). En otra variación, un medio base comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos aspectos, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina; citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; e hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM , y donde el medio base puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (1) vitamina B2 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l); (2) vitamina B6 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l); (3) vitamina B9 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l); y (4) vitamina B12 (que en un aspecto está presente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l). En cualquiera de las variaciones en el presente documento, el medio base puede comprender además una cualquiera o más de: (1) vitamina B1 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM), (2) vitamina B3 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM), (3) vitamina B5 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM), y (4) vitamina B7 (que en un aspecto está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM).

También se proporciona un procedimiento de preparación de un medio de cultivo de células para su uso en el cultivo de una célula, en el que el procedimiento comprende combinar uno cualquiera o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en (a) cistina y/o cisteína; (b) vitamina B2, (c) vitamina B6 (piridoxina y/o piridoxal), (d) vitamina B9, (e) vitamina B12, (f) una fuente de hierro, tal como citrato férrico, y (g) hidrocortisona, en el que cada uno de (a)-(g) se proporciona en las cantidades como se describe en la tabla 1. En el presente documento también se proporciona un procedimiento de preparación de un medio de cultivo de células para su uso en el cultivo de una célula, en el que el procedimiento comprende combinar uno cualquiera o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en (a) vitamina B1; (b) vitamina B2; (c) vitamina B3; (d) vitamina B5; (e) vitamina B6; (f) vitamina B7; (g) vitamina B9; (h) vitamina B12; (i) una fuente de hierro, tal como citrato férrico; (j) cistina; y (k) cisteína en las cantidades como se describe en la tabla 1A. En una variación, el procedimiento comprende añadir uno cualquiera o más componentes en los medios como se describe en el presente documento (por ejemplo, tabla 1 o tabla 1A) a una composición adecuada para el cultivo de células, en el que el uno o más componentes en los medios se pueden añadir a la composición secuencial o simultáneamente. En otra variación, el procedimiento comprende combinar uno cualquiera o más componentes en los medios como se describe en el presente documento (por ejemplo, tabla 1 o tabla 1A) en una composición adecuada para el cultivo de células en un primer periodo de tiempo y en el que el procedimiento comprende además añadir una cantidad de uno o más componentes en los medios en un segundo

periodo de tiempo, tal como al menos una vez, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, etc. durante un ciclo de cultivo de células. En algunos modos de realización, un ciclo de cultivo de células es de al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18, días, 19 días, 20 días o cualquier número de días en los que las células pueden permanecer en el cultivo de células mientras todavía siguen siendo viables. En una variación de un procedimiento de preparación de un medio de cultivo de células para su uso en el cultivo de una célula, se añade cistina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 300 mg/l (en algunos aspectos, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina, se añade vitamina B2 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2, se añade vitamina B6 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6, se añade vitamina B9 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9, y se añade vitamina B12 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 en el medio de cultivo de células. En otra variación de un procedimiento de preparación de un medio de cultivo de células para su uso en el cultivo de una célula, se añade cistina en una cantidad para proporcionar cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos aspectos, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM, se añade vitamina B2 en una cantidad para proporcionar vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μ M a aproximadamente 0,72 μ M, se añade vitamina B6 en una cantidad para proporcionar vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μ M a aproximadamente 30,0 μ M, se añade vitamina B9 en una cantidad para proporcionar vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μ M a aproximadamente 22,0 μ M, y se añade vitamina B12 en una cantidad para proporcionar vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μ M a aproximadamente 1,5 μ M en el medio de cultivo de células.

En algunas variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base. En otras variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células de alimentación. En algunas variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base que comprende uno cualquiera o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en (a) cistina; (b) vitamina B2, (c) vitamina B6 (piridoxina y/o piridoxal), (d) vitamina B9, (e) vitamina B12, (f) una fuente de hierro, tal como citrato férrico y (g) hidrocortisona en las cantidades como se describe en la tabla 1, y donde el medio de cultivo de células base se enriquece (por ejemplo, en un periodo de tiempo tras el inicio de un ciclo de cultivo de células, tal como una cualquiera de al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, etc. de un ciclo de cultivo de células) con un medio de cultivo de células de alimentación que comprende (a) cisteína en las cantidades como se describe en la tabla 1. En algunas variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base que comprende uno cualquiera o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en (a) vitamina B1; (b) vitamina B2; (c) vitamina B3; (d) vitamina B5; (e) vitamina B6; (f) vitamina B7; (g) vitamina B9; (h) vitamina B12; (i) una fuente de hierro, tal como citrato férrico; y (j) cistina en las cantidades como se describe en la tabla 1A, y donde el medio de cultivo de células base se enriquece (por ejemplo, en un periodo de tiempo tras el inicio de un ciclo de cultivo de células, tal como una cualquiera de al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, etc. de un ciclo de cultivo de células) con un medio de cultivo de células de alimentación que comprende (k) cisteína en las cantidades como se describe en la tabla 1A.

Como se entendería por el experto en la técnica, los medios de cultivo de células detallados en el presente documento pueden comprender otros componentes (por ejemplo, además de uno o más de cistina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9 y vitamina B12, hierro y opcionalmente hidrocortisona) que sean útiles para el cultivo de células. Por ejemplo, se entiende que los medios de cultivo de células pueden comprender componentes adicionales, tales como aminoácidos (por ejemplo, glutamina, arginina o asparagina), vitaminas (incluyendo, pero sin limitarse a, ácido ascórbico), oligoelementos, metales de transición (incluyendo, pero sin limitarse a níquel, cobre o cinc) y otros componentes en los medios, tales como, pero sin limitarse a, hidrolizado derivado de un animal y/o planta. Cualquier medio proporcionado en el presente documento también se puede enriquecer con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se pueden incluir componentes en los medios de cultivo de células adicionales, tales como los enumerados en el presente documento, en el medio de cultivo de células a concentraciones apropiadas en diferentes momentos durante un ciclo de cultivo de células que se conocerían por los expertos en la técnica.

Un medio proporcionado en el presente documento en un aspecto da como resultado uno o más atributos de calidad del producto favorables cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con los atributos de calidad del polipéptido cuando se produce en un medio diferente. La producción de un producto de proteínas (por ejemplo, un producto de anticuerpos) con una distribución de variantes de carga alterada puede afectar a los atributos de calidad de un producto de proteínas, tal como el color de los productos de proteínas. Además, las especies reactivas del oxígeno (ERO) formadas a través del uso de determinados componentes en los medios pueden oxidar aminoácidos específicos y producir productos de oxidación. La presencia de dichas variantes del producto también puede alterar los atributos de calidad del producto de un producto de proteínas, tal como el color. El color de una composición que comprende un polipéptido producido con unos medios detallados en el presente documento (incluyendo una composición que comprende al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido, tal como

un anticuerpo) en un aspecto tiene un valor de patrón de referencia de color como se describe en la tabla 2. En variaciones particulares, el color de una composición que comprende un polipéptido producido con unos medios detallados en el presente documento (incluyendo una composición que comprende al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido, tal como un anticuerpo) en un aspecto tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado del grupo que consiste en B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 y R7. En otro aspecto, el color de una composición que comprende un polipéptido producido con unos medios detallados en el presente documento (incluyendo una composición que comprende al menos 1 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml de polipéptido, tal como un anticuerpo) en un aspecto tiene un valor de patrón de referencia de color como se describe en la tabla 2. En algunas variaciones, el color de una composición que comprende un polipéptido producido con unos medios detallados en el presente documento (incluyendo una composición que comprende al menos 1 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml de polipéptido, tal como un anticuerpo) en un aspecto tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado del grupo que consiste en B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 y R7. Véase USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity. *United States Pharmacopoeia Inc.*, 2000, p. 1926-1927 y Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 2008, 7.^a ed. P.22 para obtener una descripción de los valores de referencia de color marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R). En una variación, un medio como se proporciona en el presente documento reduce la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas) cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas) obtenidas cuando el polipéptido se produce en un medio diferente. En otra variación, un medio reduce la presencia de especies reactivas del oxígeno cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las especies reactivas del oxígeno obtenidas cuando el polipéptido se produce en un medio diferente. En otra variación, un medio reduce la presencia de contaminantes cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con los contaminantes obtenidos cuando el polipéptido se produce en un medio diferente.

Como se describe en el presente documento, se proporcionan diversos procedimientos (tales como procedimientos de cultivo de células y procedimientos de producción de polipéptidos) que emplean medios de cultivo de células descritos en la presente sección y en otras partes.

Procedimientos

Los medios de cultivo de células detallados en el presente documento (incluyendo cualquier CDM o medios químicamente indefinidos detallados en el presente documento) se pueden usar en un procedimiento de cultivo de células para producir polipéptidos, incluyendo anticuerpos particulares. El medio se puede usar en un procedimiento de cultivo de células, ya sea mediante cultivo por lotes, cultivo por lotes alimentados o cultivo por perfusión, y se puede usar en un procedimiento de producción de un anticuerpo que incluya cualquier aspecto o variación o modo de realización del anticuerpo como se describe en el presente documento.

Se proporcionan procedimientos de cultivo de células (es decir, cultivar células) poniendo en contacto las células con un medio de cultivo de células como se detalla en el presente documento. En una variación, el procedimiento comprende poner en contacto una célula con un medio de cultivo de células que comprende uno o más componentes en el medio como se describe en la tabla 1 (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) o un medio que comprende los componentes (a), (f) y (g) o un medio que comprende cada uno de los componentes (a)-(g) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1). En una variación, el procedimiento comprende poner en contacto una célula con un medio de cultivo de células que comprende uno o más componentes en el medio como se describe en la tabla 1A (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a)-(j), o un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i), o un medio que comprende los componentes (b), (e), (g), (h) y (j) o un medio que comprende solo uno de los componentes (a)-(j) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1A). En una variación particular de un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula), el medio de cultivo de células es un CDM. En un aspecto de los procedimientos, las células crecen (es decir, se cultivan) en un medio base CDM. En otra variación particular de un procedimiento de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula), el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En un aspecto de los procedimientos, las células crecen (es decir, se cultivan) en un medio base de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos aspectos, las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento de las células. En algunos aspectos, las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de producción de las células. En algunos aspectos, el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células. En otro aspecto, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. En otro aspecto adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. Aún en otro aspecto adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. En otro aspecto adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar cisteína de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM en el medio de cultivo de células. Aún en otro aspecto adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente cisteína 0,8 mM en el medio de cultivo de células.

También se proporcionan procedimientos de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo

de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en los que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células químicamente definido comprende uno o más componentes en el medio como se describe en la tabla 1 (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) o un medio que comprende los componentes (a), (f) y (g) o un medio que comprende cada uno de los componentes (a)-(g) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1). En otra variación, en el presente documento se proporcionan procedimientos de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en los que: (a) la célula expresa el polipéptido y (b) el medio de cultivo de células comprende uno o más componentes en el medio como se describe en la tabla 1A (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a)-(j), o un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i), o un medio que comprende los componentes (b), (e), (g), (h) y (j) o un medio que comprende solo uno de los componentes (a)-(j) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 1A). En una variación particular de un procedimiento de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, el medio de cultivo de células es un CDM. En un aspecto de los procedimientos, las células crecen (es decir, se cultivan) en un medio base CDM. En otra variación particular de un procedimiento de producción de un polipéptido mediante el cultivo en un medio de cultivo de células (es decir, cultivar en un medio de cultivo de células) de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En un aspecto de los procedimientos, las células crecen (es decir, se cultivan) en un medio base de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos aspectos, el cultivo es durante la fase de crecimiento de la célula. En algunos aspectos, el cultivo es durante la fase de producción de la célula. En algunas variaciones, el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células. En otra variación, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. En otra variación adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. Aún en otra variación adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células. En otra variación adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar cisteína de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM en el medio de cultivo de células. Aún en otra variación adicional, se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente cisteína 0,8 mM en el medio de cultivo de células.

También se proporcionan procedimientos de administración de un polipéptido como se detalla en el presente documento. Por ejemplo, se proporciona un procedimiento para administrar a un individuo una formulación que comprende un polipéptido, en el que la formulación tiene el polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. En otro ejemplo, se proporciona un procedimiento para administrar a un individuo una formulación que comprende un polipéptido, en el que la formulación tiene el polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). Las formulaciones de los polipéptidos se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desean para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En consecuencia, las formulaciones que contienen un polipéptido como se proporciona en el presente documento pueden ser adecuadas para su inyección, tal como inyección subcutánea en un individuo (por ejemplo, inyección subcutánea en un ser humano). En algunos aspectos, una formación que contiene un polipéptido adecuada para su inyección (por ejemplo, adecuada para su inyección subcutánea) está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. En algunos aspectos, una formación que contiene un polipéptido adecuada para su inyección (por ejemplo, adecuada para su inyección subcutánea) está a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas, incluyendo, pero sin limitarse a administraciones únicas o múltiples en diversos puntos de tiempo, administración con inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

Se proporcionan otros procedimientos por todo el documento, tal como en el breve sumario de la invención y en otras partes.

65 **Células**

Los procedimientos y composiciones proporcionados pueden emplear cualquier célula que sea adecuada para el crecimiento y/o producción de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) en un medio descrito en el presente documento, incluyendo células animales, de levadura o de insecto. En un aspecto, una célula de los procedimientos y composiciones es cualquier célula de mamífero o tipo de célula adecuado para el cultivo de células y para la expresión de polipéptidos. Por lo tanto, los procedimientos proporcionados en el presente documento (por ejemplo, procedimientos de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) y/o producción de un polipéptido) y composiciones pueden emplear cualquier tipo adecuado de célula, incluyendo una célula animal. En un aspecto, los procedimientos y composiciones emplean una célula de mamífero. Los procedimientos y composiciones también pueden emplear células de hibridoma. En una variación, la célula de mamífero es una célula distinta de hibridoma de mamífero que se ha transformado con ácido nucleico aislado exógeno que codifica un polipéptido deseado, tal como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a ligando) y anticuerpos quiméricos. En una variación, los procedimientos y composiciones emplean células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En una variación particular, los procedimientos y composiciones emplean células CHO. En una variación particular, se emplea el cultivo de líneas de células CHO y la expresión de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) a partir de líneas de células CHO. Los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) se pueden segregar en el medio (por ejemplo, CDM) del que se pueden aislar y/o purificar los polipéptidos o el polipéptido se puede liberar en el medio mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido.

Los procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido de interés en cultivos de células de vertebrados recombinantes se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); Levinson *et al.*; el documento EP 117.060; y el documento EP 117.058. Un plásmido útil en particular para la expresión en cultivo de células de mamífero del polipéptido es pRK5 (pub. EP n.º 307.247) o pSV16B (pub. PCT n.º WO 91/08291 publicada el 13 de junio de 1991).

Las células huésped se transforman con vectores de expresión o clonación y se cultivan en medios nutritivos modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Para las células de mamífero son preferentes el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978) o el procedimiento con Lipofectamine.TM. (Gibco BRL) de Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1993). Los aspectos generales de las transformaciones de los sistemas de huéspedes de células de mamífero se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, por Axel en la pat. de EE. UU. n.º 4.399.216 concedida el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véanse, por ejemplo, Keown *et al.*, Methods in Enzymology (1989), Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

Los procedimientos y composiciones también abarcan el uso de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales en cultivos de células. Los anticuerpos monoclonales se preparan recuperando células inmunitarias (típicamente células de bazo o linfocitos de tejido de los ganglios linfáticos) de animales inmunizados y cultivando de forma indefinida las células de manera convencional, por ejemplo, mediante fusión con células de mieloma o mediante transformación por el virus de Epstein-Barr (EB) y cribando en cuanto a los clones que expresan el anticuerpo deseado. La técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511 (1976) y también descrita por Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981) se ha aplicado ampliamente para producir líneas de células híbridas que segregan concentraciones altas de anticuerpos monoclonales frente a muchos antígenos específicos.

55 Polipéptidos

Los polipéptidos producidos por las composiciones (células) y procedimientos detallados en el presente documento y presentes en las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser homólogos a la célula huésped, o, preferentemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, externos a la célula huésped que se utiliza, tal como una proteína humana producida por una célula de ovario de hámster chino o un polipéptido de levadura producido por una célula de mamífero. En una variación, el polipéptido es un polipéptido de mamífero (tal como un anticuerpo) segregado directamente en el medio por la célula huésped. En otra variación, el polipéptido se libera en el medio mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido.

65 En una variación, el polipéptido es una secuencia de aminoácidos para la que la longitud de cadena es suficiente para producir las concentraciones más altas de estructura terciaria y/o cuaternaria. En un aspecto, el polipéptido tendrá un

peso molecular de al menos aproximadamente 5-20 kD, de forma alternativa de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferentemente de al menos aproximadamente 20 kD.

Se puede producir cualquier polipéptido que sea expresable en una célula huésped de acuerdo con la presente divulgación y puede estar presente en las composiciones proporcionadas. El polipéptido se puede expresar a partir de un gen que sea endógeno a la célula huésped o a partir de un gen que se introduzca en la célula huésped a través de genomanipulación. El polipéptido puede ser uno que exista en la naturaleza, o, de forma alternativa, puede tener una secuencia que se haya genomanipulado o seleccionado mediante la mano del hombre. Un polipéptido genomanipulado se puede ensamblar a partir de otros segmentos de polipéptido que existan individualmente en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos que no sean naturales.

Los polipéptidos que se pueden expresar deseablemente de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán sobre la base de una actividad biológica o química interesante. Por ejemplo, se puede emplear la presente invención para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. farmacéutica o comercialmente pertinente.

Se pueden producir diversos polipéptidos de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, y presentes en las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los ejemplos de polipéptidos bacterianos incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina y beta-lactamasa. Los ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen moléculas, tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana; hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (regulación en función de la activación, expresada y segregada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina, proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 o TGF-beta 5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los anticuerpos son ejemplos de polipéptidos de mamífero producidos de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento y que pueden estar presentes en las composiciones proporcionadas. Los anticuerpos son una clase preferente de polipéptidos que presentan especificidad de unión a un antígeno específico. Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina naturales que tienen estructuras variables, todas en base al plegamiento de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras" que se unen mediante enlaces disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera comprende por sí misma una región "constante" (C) y una "variable" (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte y función estructurales en las interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunitarios. La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo de unirse

específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se determina mediante las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente en el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados mediante regiones más cortas de variabilidad en extremo llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Rabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada región V comprende típicamente tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR", cada una de las cuales contiene un "bucle hipervariable") y cuatro regiones estructurales. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado particular, por lo tanto, incluirá típicamente las tres CDR y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones estructurales intercaladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos de cuatro cadenas clásicos tienen sitios de unión a antígeno que se definen por los dominios VH y VL en cooperación. Determinados anticuerpos, tales como los anticuerpos de camello y de tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en sitios de unión formados solo por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas genomanipuladas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre VH y VL.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en las secuencias entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL, y alrededor de aproximadamente 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el VH (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el VL, y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en el VH (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

Los residuos de la "región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y de uno de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (immunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos a clases diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las clases diferentes de anticuerpos se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases diferentes de inmunoglobulinas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido única. En algunos modos de realización, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios VH y VL que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Plückerthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH - VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Se describen más completamente diacuerpos, por ejemplo, en el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Para los propósitos en el presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un "anticuerpo no marcado" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no se conjuga a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Un anticuerpo se dirige frente a un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un individuo que padece una enfermedad o afección puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se pueden usar anticuerpos dirigidos frente a antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolípidicos asociados a tumor; véase la pat. de EE. UU. n.º 5.091.178).

Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas, tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular (TF) y factor de Von

Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (regulación en función de la activación, expresada y segregada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 o TGF-beta 5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VFA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Las dianas moleculares preferentes para los anticuerpos detallados en el presente documento incluyen proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa 4/beta 7 e integrina alfa v/beta 3, incluyendo las subunidades alfa o bien beta de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; tromboplastina tisular (TF); interferón alfa (IFN alfa); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTFA-4; proteína C y similares.

Los anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos, incluyendo, a su vez, fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se pueden producir mediante los procedimientos en el presente documento incluyen, sin limitación, anti-HER2, anticuerpo 2C4, anti-VEGF, anticuerpo C2B8, antiCD11a, anti tromboplastina tisular, IgG4b, anti-CD40, anti-CD20, anti-IgE, E25, E26, anti-PCSK9 y anti-Beta7.

Crecimiento de las células y producción de polipéptidos

En general, las células se combinan (se ponen en contacto) con cualquiera de los medios de cultivo de células descritos en el presente documento en una o más condiciones que promuevan cualquiera del crecimiento de las células, mantenimiento y/o producción de polipéptidos. Los procedimientos de cultivo de una célula (es decir, cultivar una célula) y producción de un polipéptido emplean un recipiente de cultivo (biorreactor) para que contenga la célula y el medio de cultivo de células. El recipiente de cultivo puede estar compuesto por cualquier material que sea adecuado para cultivar células, incluyendo vidrio, plástico o metal. Típicamente, el recipiente de cultivo será de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000 litros o más. Las condiciones de cultivo que se pueden ajustar durante el procedimiento de cultivo incluyen, pero no se limitan a, pH y temperatura.

Un cultivo de células se mantiene, en general, en la fase de crecimiento inicial en condiciones propicias para la supervivencia, crecimiento y viabilidad (mantenimiento) del cultivo de células. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo de célula, el organismo del cual se derivó la célula y la naturaleza y el carácter del polipéptido expresado.

La temperatura del cultivo de células en la fase de crecimiento inicial se seleccionará principalmente en base al intervalo de temperaturas a las que el cultivo de células es viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO se cultivan bien a 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamífero se cultivan bien en un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C. Preferentemente, las células de mamífero se cultivan bien en el intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas en las que cultivar células, dependiendo de las necesidades de las células y de los requisitos de producción.

En un modo de realización de la presente divulgación, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una temperatura única y constante. En otro modo de realización, se mantiene la temperatura de la fase de crecimiento inicial en un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede incrementar o disminuir de forma constante durante la fase de crecimiento inicial. De forma alternativa, se puede incrementar o disminuir la temperatura en cantidades discretas en diversos momentos durante la fase de crecimiento inicial. Un experto en la técnica podrá determinar si se deberían usar temperaturas únicas o múltiples, y si la temperatura se debería ajustar de forma

constante o en cantidades discretas.

Las células se pueden cultivar durante la fase de crecimiento inicial durante un periodo de tiempo mayor o menor. En una variación, las células se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables que sea un porcentaje dado de la densidad de células viables máxima que las células alcanzarían con el tiempo si se dejaran cultivar sin alteraciones. Por ejemplo, las células se pueden cultivar durante un periodo de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables deseada de un 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad de células viables máxima.

En otro modo de realización, se deja que las células se cultiven durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de partida del cultivo de células, la temperatura a la que se cultivan las células y el ritmo de crecimiento intrínseco de las células, se pueden cultivar las células durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, se puede dejar que las células se cultiven durante un mes o más.

El cultivo de células se puede agitar o mover violentamente durante la fase de cultivo inicial a fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes en las células. De acuerdo con la presente divulgación, un experto en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, incluyendo, pero sin limitarse al pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, se puede controlar el pH suministrando una cantidad apropiada de ácido o base y se puede controlar la oxigenación con dispositivos de inyección de gas que se conocen bien en la técnica.

Una etapa de cultivo inicial es una fase de crecimiento, en la que se modifican las condiciones de cultivo de células por lotes para potenciar el crecimiento de células recombinantes, para producir un conjunto de semillas. La fase de crecimiento se refiere en general al periodo de crecimiento exponencial donde las células en general se dividen rápidamente, por ejemplo, el cultivo. Durante esta fase, las células se cultivan durante un periodo de tiempo, normalmente de 1 a 4 días, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 días, y en dichas condiciones en las que el crecimiento de las células es óptimo. La determinación del ciclo de cultivo para la célula huésped se puede determinar para la célula huésped particular mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En la fase de crecimiento, se pueden suministrar el medio de cultivo base y las células al recipiente de cultivo en lotes. El medio de cultivo en un aspecto contiene suero de menos de aproximadamente al 5 % o de menos de al 1 % o de menos de al 0,1 % y otras proteínas derivadas de animal. Sin embargo, si se desea, se pueden usar suero y proteínas derivadas de animal. En una variación particular, el medio base es un CDM. Se pueden usar los aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y otros componentes en los medios en una o dos veces los intervalos especificados en la patente europea EP 307.247 o la pat. de EE. UU. n.º 6.180.401.

De forma alternativa, los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma), son adecuados para el cultivo de las células animales y se pueden enriquecer con constituyentes en los medios químicamente definidos como se detalla en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit como se proporciona). Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980), las pat. de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; o 4.560.655; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; reedición de la pat. de EE. UU. n.º 30.985; o la pat. de EE. UU. n.º 5.122.469 como medios de cultivo para las células huésped, cada uno de los cuales se puede enriquecer con constituyentes en los medios químicamente definidos como se detalla en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit como se proporciona). En un aspecto, si un medio contiene un producto de origen animal, el medio se puede enriquecer con CDM.

Cualquier medio proporcionado en el presente documento también se puede enriquecer según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la técnica.

En un punto particular de su cultivo, las células pueden formar un inóculo para inocular un medio de cultivo al comienzo del cultivo en la fase de producción. De forma alternativa, la fase de producción puede ser continua con la fase de crecimiento. La fase de crecimiento de las células se sigue en general por una fase de producción de polipéptidos.

Durante la fase de producción de polipéptidos, el cultivo de células se puede mantener en un segundo conjunto de condiciones de cultivo (en comparación con la fase de crecimiento) propicias para la supervivencia y la viabilidad del cultivo de células y apropiadas para la expresión del polipéptido deseado. Por ejemplo, durante la fase de producción posterior, las células CHO expresan polipéptidos y proteínas recombinantes en un intervalo de 25 °C a 35 °C. Se pueden emplear cambios de temperatura discretos múltiples para incrementar la densidad o viabilidad de células o

para incrementar la expresión del polipéptido o proteína recombinante. En un aspecto, un medio como se proporciona en el presente documento reduce la presencia de contaminantes cuando se usa en un procedimiento de incrementar la producción de polipéptidos en comparación con los contaminantes obtenidos cuando el polipéptido se produce en un medio diferente. En una variación, los contaminantes son variantes de carga o especies reactivas del oxígeno. En un aspecto, un medio como se proporciona en el presente documento reduce la intensidad de color de un producto de polipéptidos cuando se usa en un procedimiento de incrementar la producción del polipéptido en comparación con la intensidad de color obtenida cuando el producto de polipéptidos se produce en medios diferentes. En una variación, un procedimiento de incrementar la producción de polipéptidos comprende una etapa de cambio de temperatura durante la fase de producción de polipéptidos. En otra variación, una etapa de cambio de temperatura comprende un cambio de temperatura de 31 °C a 37 °C, de 32 °C a 37 °C, de 33 °C a 37 °C, de 34 °C a 37 °C, de 35 °C a 37 °C, de 36 °C a 37 °C, de 31 °C a 32 °C, de 31 °C a 33 °C, de 31 °C a 34 °C, de 31 °C a 35 °C o de 31 °C a 36 °C.

Las células se pueden mantener en la fase de producción posterior hasta que se alcance una densidad de células o un valor de producción deseado. En un modo de realización, se mantienen las células en la fase de producción posterior hasta que el valor con respecto al polipéptido recombinante alcanza un máximo. En otros modos de realización, se puede obtener el cultivo antes de este punto. Por ejemplo, las células se pueden mantener durante un periodo de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables de un 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad de células viables máxima. En algunos casos, puede ser deseable dejar que la densidad de células viables alcance un máximo, y, a continuación, dejar que la densidad de células viables descienda a alguna concentración antes de obtener el cultivo.

En determinados casos, puede ser beneficioso o necesario enriquecer el cultivo de células durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes en el medio que se hayan reducido o metabolizado por las células. Por ejemplo, podría ser ventajoso enriquecer el cultivo de células con nutrientes u otros componentes en el medio que se observe que se hayan reducido durante la supervisión del cultivo de células. De forma alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario enriquecer el cultivo de células antes de la fase de producción posterior. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario enriquecer el cultivo de células con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía.

Purificación de polipéptidos

El polipéptido de interés se recupera preferentemente del medio de cultivo como un polipéptido segregado, aunque también se puede recuperar de los lisados de células huésped cuando se expresa directamente sin una señal secretora. En un aspecto, el polipéptido producido es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal.

El medio de cultivo o el lisado se pueden centrifugar para eliminar los restos de células particulados. En lo sucesivo, el polipéptido se puede purificar a partir de proteínas y polipéptidos solubles en contaminantes, siendo los siguientes procedimientos ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes, tales como IgG. Un inhibidor de proteasa, tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Un experto en la técnica apreciará que los procedimientos de purificación adecuados para el polipéptido de interés pueden requerir una modificación que explique los cambios en el carácter del polipéptido tras su expresión en cultivos de células recombinantes. Los anticuerpos se pueden purificar, en general, usando técnicas cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A con una etapa de elución a pH bajo y cromatografía de intercambio iónico para eliminar las impurezas del procedimiento). Las proteínas purificadas se pueden concentrar para proporcionar una especialidad farmacéutica de proteínas concentradas, por ejemplo, una con una concentración de proteínas de al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o una concentración de aproximadamente 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml. Las proteínas purificadas también se pueden concentrar para proporcionar una especialidad farmacéutica de proteínas concentradas, por ejemplo, una con una concentración de proteínas de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o una concentración de al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml o a aproximadamente 150 mg/ml). Se entiende que los productos de polipéptidos concentrados se pueden concentrar hasta concentraciones que sean permisibles en las condiciones de concentración, por ejemplo, hasta una concentración en la que el polipéptido ya no sea soluble en solución. Por ejemplo, un procedimiento de purificación de polipéptidos puede comprender las etapas de obtención del caldo de cultivo de células a partir de las células productoras de polipéptidos y purificación del polipéptido a través de cromatografía de afinidad con proteína A con purificación adicional a través de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, filtración para la eliminación de virus y una etapa final de ultrafiltración y diafiltración para la formulación y concentración finales del polipéptido. Los ejemplos no limitantes de procedimientos para producir y purificar polipéptidos para formulaciones de fármacos se describen en Kelley, B. *MABs.*, 2009, 1(5):443-452.

Evaluación del color de los polipéptidos

Los polipéptidos producidos mediante los procedimientos detallados en el presente documento y presentes en las composiciones proporcionadas se pueden evaluar en cuanto al color en cualquier etapa del procedimiento de purificación de proteínas. Un procedimiento para evaluar el color puede implicar obtener el caldo de cultivo de células a partir de las células cultivadas en los medios detallados en el presente documento, purificar el polipéptido a partir del caldo de cultivo de células para obtener una composición (por ejemplo, una solución) que comprende el polipéptido y evaluar en cuanto al color la solución que comprende el polipéptido. En una variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación con cromatografía de afinidad con proteína A. En otra variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. En otra variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Aún en otra variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Todavía en otra variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En una variación, se evalúa en cuanto al color una composición que comprende el polipéptido después de su purificación mediante filtración, incluyendo microfiltración o ultrafiltración. En una variación, la composición que comprende el polipéptido se concentra antes de evaluarse en cuanto al color (por ejemplo, la composición puede comprender al menos 100 mg/ml, 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido, tal como un anticuerpo). En algunas variaciones, la composición concentrada comprende al menos 1 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml o 75 mg/ml de polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) antes de evaluarse en cuanto al color. La composición que comprende el polipéptido se puede concentrar mediante centrifugación, dispositivos con filtro, membranas semipermeables, diálisis, precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alto rendimiento o cromatografía de interacción hidrófoba. En una variación, el polipéptido se puede concentrar mediante liofilización y resuspender antes de su evaluación en cuanto al color. La composición que comprende el polipéptido se puede evaluar en cuanto al color después de su purificación con una o más de las técnicas detalladas en el presente documento. En el presente documento se contempla la evaluación del color de la composición que comprende el polipéptido después de que la composición haya sufrido uno o más ciclo(s) de congelación-descongelación. En el presente documento se contemplan además procedimientos para la evaluación del color del caldo de cultivo de células que contiene el polipéptido antes de la purificación o concentración del polipéptido.

Los polipéptidos producidos mediante los procedimientos detallados en el presente documento con los medios descritos en el presente documento (o presentes en las composiciones proporcionadas) se pueden evaluar en cuanto al color mediante el uso de uno o más patrones de color visual. Los procedimientos para la evaluación del color de la composición que comprende el polipéptido incluyen el uso de un patrón de color nacional o internacional, tal como, pero sin limitarse al patrón de color de la Farmacopea de los Estados Unidos y al patrón de color de la Farmacopea Europea. Véase USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity. *United States Pharmacopoeia Inc.*, 2000, p. 1926-1927 y Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 2008, 7.^a ed. P.22. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de color, opalescencia y coloración (COC) para evaluar el color de una solución que contiene el polipéptido. En una variación, se usa un tubo idéntico de vidrio neutro, transparente e incoloro de 12 mm de diámetro externo para comparar 2,0 ml de la composición que comprende el polipéptido con 2,0 ml de agua o del disolvente o de la solución de referencia prescrita en la ficha técnica. Los colores se comparan en luz natural difusa y se observan horizontalmente con respecto a un fondo blanco para la determinación, medición o evaluación del color. En otra variación, se usan tubos idénticos de vidrio neutro, transparente e incoloro, con una base plana y un diámetro interno de 15 mm a 25 mm para comparar la composición que comprende el polipéptido con agua o el disolvente o la solución de referencia prescrita en la ficha técnica, siendo la profundidad de la capa de 40 mm. Los colores se comparan en luz natural difusa y se observan verticalmente con respecto a un fondo blanco para la determinación, medición o evaluación del color. En una variación, se puede realizar la determinación, medición o evaluación del color mediante inspección visual humana. En otra variación, se puede realizar la determinación, medición o evaluación del color usando un procedimiento automatizado. Por ejemplo, se pueden cargar los tubos en una máquina que forme imágenes de los tubos para el procesamiento de las imágenes con un algoritmo para determinar, medir o evaluar el color. Se entiende que los patrones de referencia para el ensayo de COC pueden ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia marrón se les puede dar un valor de patrón de referencia marrón de B1 (el más oscuro), B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo parduzco se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo parduzco de BY1 (el más oscuro), BY2, BY3, BY4, BY5, BY6 o BY7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo de Y1 (el más oscuro), Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 o Y7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo verdoso se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo verdoso de GY1 (el más oscuro), GY2, GY3, GY4, GY5, GY6 o GY7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia rojo se les puede dar un valor de patrón de referencia rojo de R1 (el más oscuro), R2, R3, R4, R5, R6 o R7 (el más claro). En un aspecto, un color aceptable es cualquier color, excepto el que se mide como el más oscuro en una escala proporcionada en el presente documento (por ejemplo, excepto R1 para un valor de patrón de referencia rojo). En una variación, el color de la composición que comprende el polipéptido producido por células cultivadas en los medios detallados en el presente documento tiene un valor de patrón de referencia como se describe en la tabla 2. Como se

ES 2 716 301 T3

describe en el presente documento, en un aspecto se entiende que los medios que se pueden usar en los procedimientos y composiciones en el presente documento dan como resultado una composición de polipéptido (que en una variación es una composición que comprende al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido) que tiene un valor de color de patrón de referencia seleccionado del grupo que consiste en B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 y R7. En un aspecto, los medios que se pueden usar en los procedimientos y composiciones en el presente documento dan como resultado una composición de polipéptido (que en una variación es una composición que comprende al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido) que tiene un valor de color de patrón de referencia mayor que uno cualquiera de B4, B5, B6, B7, B8, BY4, BY5, BY6, Y4, Y5, Y6, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5 y R6. Como se entendería por el experto en la técnica, las descripciones de los valores de color de patrón de referencia son aplicables a, y pueden modificar además las descripciones de, cualquiera de los medios, procedimientos o composiciones detallados en el presente documento.

Tabla 2. Valores de patrones de referencia ejemplares

Patrón referencia	de	Valor de patrón de referencia
(a) Marrón		de aproximadamente B1 a aproximadamente B9; de aproximadamente B1 a aproximadamente B8; de aproximadamente B1 a aproximadamente B7; de aproximadamente B1 a aproximadamente B6; de aproximadamente B1 a aproximadamente B5; de aproximadamente B1 a aproximadamente B4; de aproximadamente B1 a aproximadamente B3; de aproximadamente B1 a aproximadamente B2; de aproximadamente B2 a aproximadamente B9; de aproximadamente B3 a aproximadamente B9; de aproximadamente B4 a aproximadamente B9; de aproximadamente B5 a aproximadamente B9; de aproximadamente B6 a aproximadamente B9; de aproximadamente B7 a aproximadamente B9; de aproximadamente B8 a aproximadamente B9; de aproximadamente B2 a aproximadamente B8; de aproximadamente B3 a aproximadamente B7; de aproximadamente B4 a aproximadamente B6; de aproximadamente B5 a aproximadamente B7; de aproximadamente B6 a aproximadamente B8; aproximadamente cualquiera de B1 o B2 o B3 o B4 o B5 o B6 o B7 o B8 o B9; al menos aproximadamente cualquiera de B1 o B2 o B3 o B4 o B5 o B6 o B7 o B8 o B9. Preferentemente de B3 a B9. Lo más preferentemente de B4 a B9.
(b) Amarillo parduzco		de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY6; de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY5; de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY4; de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY3; de aproximadamente BY1 a aproximadamente BY2; de aproximadamente BY2 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY3 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY4 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY5 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY6 a aproximadamente BY7; de aproximadamente BY2 a aproximadamente BY6; de aproximadamente BY3 a aproximadamente BY5; de aproximadamente BY4 a aproximadamente BY6; de aproximadamente BY6; de aproximadamente BY5 a aproximadamente BY6; aproximadamente cualquiera de BY1 o BY2 o BY3 o BY4 o BY5 o BY6 o BY7; al menos aproximadamente cualquiera de BY1 o BY2 o BY3 o BY4 o BY5 o BY6 o BY7. Preferentemente de BY3 a BY7. Lo más preferentemente de BY4 a BY7.
(c) Amarillo		de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y6; de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y5; de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y4; de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y3; de aproximadamente Y1 a aproximadamente Y2; de aproximadamente Y2 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y3 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y4 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y5 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y6 a aproximadamente Y7; de aproximadamente Y2 a aproximadamente Y6; de aproximadamente Y3 a aproximadamente Y5; de aproximadamente Y4 a aproximadamente Y6; de aproximadamente Y5 a aproximadamente Y6; aproximadamente cualquiera de Y1 o Y2 o Y3 o Y4 o Y5 o Y6 o Y7; al menos aproximadamente cualquiera de Y1 o Y2 o Y3 o Y4 o Y5 o Y6 o Y7. Preferentemente de Y3 a Y7. Lo más preferentemente de Y4 a Y7.
(d) Amarillo verdoso		de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY6; de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY5; de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY4; de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY3; de aproximadamente GY1 a aproximadamente GY2; de aproximadamente GY2 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY3 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY4 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY5 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY6 a aproximadamente GY7; de aproximadamente GY2 a aproximadamente GY6; de aproximadamente GY3 a aproximadamente GY5; de aproximadamente GY4 a

	aproximadamente GY6; de aproximadamente GY5 a aproximadamente GY6; aproximadamente cualquiera de GY1 o GY2 o GY3 o GY4 o GY5 o GY6 o GY7; al menos aproximadamente cualquiera de GY1 o GY2 o GY3 o GY4 o GY5 o GY6 o GY7. Preferentemente de GY3 a GY7. Lo más preferentemente de GY4 a GY7.
(e) Rojo	de aproximadamente R1 a aproximadamente R7; de aproximadamente R1 a aproximadamente R6; de aproximadamente R1 a aproximadamente R5; de aproximadamente R1 a aproximadamente R4; de aproximadamente R1 a aproximadamente R3; de aproximadamente R1 a aproximadamente R2; de aproximadamente R2 a aproximadamente R7; de aproximadamente R3 a aproximadamente R7; de aproximadamente R4 a aproximadamente R7; de aproximadamente R5 a aproximadamente R7; de aproximadamente R6 a aproximadamente R7; de aproximadamente R2 a aproximadamente R6; de aproximadamente R3 a aproximadamente R5; de aproximadamente R4 a aproximadamente R6; de aproximadamente R5 a aproximadamente R6; aproximadamente cualquiera de R1 o R2 o R3 o R4 o R5 o R6 o R7; al menos aproximadamente cualquiera de R1 o R2 o R3 o R4 o R5 o R6 o R7. Preferentemente de R3 a R7. Lo más preferentemente de R4 a R7.

En otro ejemplo, los polipéptidos producidos mediante los procedimientos detallados en el presente documento con los medios descritos en el presente documento (o presentes en las composiciones proporcionadas) se pueden evaluar en cuanto al color con un ensayo cuantitativo. En una variación, se puede realizar el ensayo cuantitativo usando un procedimiento automatizado. En una variación, el ensayo cuantitativo es el ensayo de intensidad de fluorescencia normalizada (NIFTY) o el ensayo de color total descritos en el presente documento. Por ejemplo, una solución que contiene un polipéptido producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede evaluar en cuanto a la intensidad de color mediante el ensayo de NIFTY sometiendo una solución que comprende un polipéptido a las siguientes etapas: 1) aplicar una muestra de prueba de polipéptido a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en la que la fase móvil para SEC comprende un tampón a un pH específico con la columna mantenida a una temperatura específica; 2) supervisar el eluyente de SEC en cuanto a la absorción UV a una longitud de onda específica (por ejemplo, 280 nm) y en cuanto a la fluorescencia con una longitud de onda de excitación específica (por ejemplo, a 350 nm) y una longitud de onda de emisión (por ejemplo, a 425 nm); 3) integrar los picos de SEC de las especies de polipéptido usando programas informáticos conocidos en la técnica (por ejemplo, el programa informático Agilent Chemstation) en relación con la absorbancia UV y con los cromatogramas de emisión de fluorescencia y normalizar la fluorescencia dividiendo el área de pico de fluorescencia del pico principal entre el área de pico de absorbancia UV del pico principal; y 4) calcular la proporción de la fluorescencia normalizada de la muestra de prueba de polipéptido con respecto a la de una muestra de referencia de polipéptido que contiene un valor de COC conocido en base a cualquiera de los patrones de referencia divulgados en el presente documento, tales como marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R) para obtener un valor numérico, en los que un valor numérico más alto (por ejemplo, un valor de NIFTY más alto) indica una intensidad de color más alta y un valor numérico más bajo (por ejemplo, un valor de NIFTY más bajo) indica una intensidad de color más baja. En otro ejemplo, una solución que contiene un polipéptido producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se evalúa en cuanto a la intensidad de color mediante el ensayo de color total como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una solución que contiene un polipéptido producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede evaluar en cuanto a la intensidad de color mediante el ensayo de color total sometiendo una solución que comprende un polipéptido a las siguientes etapas: 1) obtener el espectro de absorción de una muestra de prueba de polipéptido midiendo la muestra en la región visible (380-780 nm) usando un espectrofotómetro; 2) convertir el espectro de absorción a la escala de colores CIE L*a*b* como se describe en *Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates*, Annual Book of ASTM Standards, vol. 06.01, (2011); 3) obtener una medición del color total en la que la medición representa la delta E que se corresponde con la distancia euclidiana entre la muestra de prueba de polipéptido y el agua en el espacio de color CIE L*a*b* tridimensional; y 4) determinar el valor de intensidad de color calculando la proporción de la medición del "color total" de la muestra de prueba de polipéptido con respecto a la de una muestra de referencia de polipéptido que contiene un valor de COC conocido en base a cualquiera de los patrones de referencia divulgados en el presente documento, tales como marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R), en los que un valor de color total más alto indica una intensidad de color más alta y un valor de color total más bajo indica una intensidad de color más baja.

Un ensayo de color detallado en el presente documento puede encontrar uso en la evaluación del color de cualquier solución (por ejemplo, una solución que contiene un polipéptido), incluyendo, pero sin limitarse a, las composiciones de polipéptido proporcionadas en el presente documento.

Evaluación de la variante de carga del polipéptido

Se proporcionan procedimientos para reducir la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), en los que los medios que contienen componentes a concentraciones detalladas en el presente documento reducen la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas) cuando se usan en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas) obtenidas cuando el polipéptido se produce en medios diferentes (por ejemplo, uno que no comprenda

los mismos componentes y/o concentraciones de componentes como se detalla en el presente documento). Como se entendería por el experto en la técnica, las descripciones de las variantes de carga de referencia son aplicables a, y pueden modificar además, las descripciones de cualquiera de los medios, procedimientos o composiciones detallados en el presente documento. También se entiende que cualquier variación o modo de realización de los medios proporcionados en la presente sección se aplica igualmente a las descripciones de los medios detalladas por todo el documento. Como se usa en el presente documento, el término "reduce la presencia de variantes de carga" se puede referir a las cantidades o presencia reducidas de todos los tipos de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas, variantes de carga básicas y variantes de carga neutras) o a las cantidades o presencia reducidas de variantes de carga específicas, tales como variantes de carga ácidas.

Se proporcionan procedimientos para reducir la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), así como composiciones que comprenden una concentración reducida de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), en los que los medios detallados en el presente documento reducen la presencia de variantes de carga cuando se usan en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga obtenidas cuando el polipéptido se produce en unos medios diferentes. En una variación, los medios son un medio de cultivo de células químicamente indefinido que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 y de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12. En una variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,50 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,40 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,30 mg/l. En una variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En una variación, el medio de cultivo químicamente indefinido comprende además una fuente de hierro. En una variación, la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso. En una variación, el medio de cultivo de células químicamente indefinido comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, el medio de cultivo de células químicamente indefinido comprende además hidrocortisona. En una variación, la hidrocortisona está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,25 μ M.

Se proporcionan procedimientos para reducir la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), así como composiciones que comprenden una concentración reducida de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), en los que los medios detallados en el presente documento reducen la presencia de variantes de carga cuando se usan en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga obtenidas cuando el polipéptido se produce en unos medios diferentes. En una variación, los medios son un medio de cultivo de células químicamente definido que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina, citrato férrico de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M, e hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M. En una variación, el medio de cultivo químicamente definido comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y vitamina B12. En una variación, la vitamina B2 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,50 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,40 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,30 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B6 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l o de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B9 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B9 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B12 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B12 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l.

Se proporcionan procedimientos para reducir la presencia de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), así como composiciones que comprenden una concentración reducida de variantes de carga (por ejemplo, variantes de carga ácidas), en los que los medios detallados en el presente documento reducen la presencia de variantes de carga cuando se usan en un procedimiento de producción de un polipéptido en comparación con las variantes de carga obtenidas cuando el polipéptido se produce en unos medios diferentes. En una variación, los medios

son un medio de cultivo de células químicamente indefinido que comprende de aproximadamente 300 mg/l (en algunos modos de realización, 200 mg/l) a aproximadamente 1200 mg/l de cistina, citrato férrico de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M, e hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M. En una variación, el medio de cultivo químicamente indefinido comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y vitamina B12. En una variación, la vitamina B2 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,50 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,40 mg/l. En otra variación, la vitamina B2 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 0,30 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B6 está a una concentración de desde aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B6 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 8,0 mg/l, de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 7,0 mg/l o de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 6,0 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B6 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B9 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B9 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l. En otra variación, la vitamina B12 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l. En cualquiera de las variaciones en el presente documento, la vitamina B12 está a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l.

Los polipéptidos, incluyendo las composiciones que comprenden polipéptidos, producidos mediante los procedimientos detallados en el presente documento se pueden evaluar en cuanto a la presencia de variantes de carga en cualquier etapa del procedimiento de purificación de proteínas. Un procedimiento para evaluar la presencia de variantes de carga puede implicar obtener el caldo de cultivo de células a partir de las células cultivadas en los medios detallados en el presente documento, purificar el polipéptido a partir del caldo de cultivo de células para obtener una composición que comprende el polipéptido y evaluar la composición que comprende el polipéptido en cuanto a la presencia reducida de variantes de carga en comparación con la presencia de variantes de carga en una composición que comprende el polipéptido cuando se produce en unos medios diferentes. En una variación, la composición que comprende el polipéptido puede contener variantes de carga ácidas o variantes de carga básicas. En otra variación, la composición que comprende el polipéptido comprende variantes de carga ácidas. Las variantes de carga se pueden formar debido a, pero sin limitarse a, desamidación, sialilación, escisión de lisina C terminal, glucación, amidación de lisina C terminal, amidación de glicina C terminal, formación de succinamida, oxidación de aminoácidos, eliminación de ácido siálico o combinaciones de las mismas. En el presente documento se contemplan además procedimientos para la evaluación en cuanto a la presencia de variantes de carga en el caldo de cultivo de células que contiene el polipéptido antes de la purificación o concentración del polipéptido. Los procedimientos para la detección de variantes de carga en soluciones que contienen el polipéptido incluyen el uso de técnicas de cromatografía, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía de intercambio iónico. Véase Khawli, L.A., *mAbs.*, 2010, 2(6):613-624.

En una variación de las composiciones proporcionadas en el presente documento, las variantes de carga (que en un aspecto son variantes de carga ácidas) constituyen no más de un 25 % o 20 % o 18 % o 15 % o 10 % del producto de polipéptidos. En otra variación de las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento, al menos un 75 % u 80 % u 85 % o 90 % o 95 % o más del producto de polipéptidos es una proteína de la especie principal. Como se usa en el presente documento, el término "proteína de la especie principal" puede incluir además una proteína cuantitativamente predominante como se identifica mediante la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria y/o la estructura terciaria de la proteína, así como cualquier modificación postraduccional, tal como glucosilación.

Kits

Se describe un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos. El kit puede contener constituyentes secos para que se reconstituyan, y también puede contener instrucciones de uso (por ejemplo, para su uso en el enriquecimiento de un medio con los constituyentes del kit). El kit puede contener los constituyentes en el medio proporcionados en el presente documento en cantidades adecuadas para enriquecer un medio de cultivo de células. En una variación, un kit comprende los componentes en el medio de la tabla 1. En otra variación, un kit comprende los componentes en el medio de la tabla 1A. Se proporcionan diversos modos de realización del kit ejemplares en la sección "modos de realización ejemplares". Además, la divulgación también incluye variaciones en las que el kit para enriquecer un medio de cultivo de células comprende uno cualquiera o más componentes en los medios de la tabla 1 o tabla 1A en una cantidad para proporcionar el uno o más componentes en los medios en el medio de cultivo de células a una concentración como se muestra en la tabla 1 o tabla 1A. En una variación, un kit para enriquecer un medio de cultivo de células comprende cistina en una cantidad para proporcionar cistina de aproximadamente 0,8 mM (en un aspecto, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM en el medio de cultivo de células; vitamina B2 en una cantidad para proporcionar vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μ M a aproximadamente

0,72 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B6 en una cantidad para proporcionar vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B9 en una cantidad para proporcionar vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM en el medio de cultivo de células; y vitamina B12 en una cantidad para proporcionar vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM en el medio de cultivo de células. En cualquier variación en el presente documento, el kit puede comprender además una fuente de hierro, tal como citrato férrico o sulfato ferroso, en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM (en algunos aspectos, de 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM) en el medio de cultivo de células.

En otra variación, un kit para enriquecer un medio de cultivo de células comprende cistina en una cantidad para proporcionar cistina de aproximadamente 0,8 mM (en algunos aspectos, 0,7 mM) a aproximadamente 2,5 mM en el medio de cultivo de células; citrato férrico en una cantidad para proporcionar citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM en el medio de cultivo de células; hidrocortisona en una cantidad para proporcionar hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B2 en una cantidad para proporcionar vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B6 en una cantidad para proporcionar vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B9 en una cantidad para proporcionar vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM en el medio de cultivo de células; y vitamina B12 en una cantidad para proporcionar vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM en el medio de cultivo de células.

En cualquier variación en el presente documento, el kit puede comprender además una cualquiera o más de vitamina B1 en una cantidad para proporcionar vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM en el medio de cultivo de células;

vitamina B3 en una cantidad para proporcionar vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM en el medio de cultivo de células; vitamina B5 en una cantidad para proporcionar vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM en el medio de cultivo de células; y vitamina B7 en una cantidad para proporcionar vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,24 μM en el medio de cultivo de células.

En cualquiera de las variaciones en el presente documento, el kit puede comprender además cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína (en algunos aspectos, de 0,5 mM a aproximadamente 2,0 mM) en el medio de cultivo de células.

En cualquiera de las variaciones en el presente documento, los medios de cultivo de células pueden ser un CDM o unos medios de cultivo de células químicamente indefinidos.

Composiciones

También se proporcionan composiciones que comprenden el medio de cultivo de células y uno o más de otros componentes, tales como una célula o un polipéptido deseado (por ejemplo, un anticuerpo). En una variación, se proporciona una composición que comprende: (a) una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento. En otra variación se proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento, donde en un aspecto el polipéptido se segrega en el medio por una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. Aún en otra variación, se proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento, donde en un aspecto el polipéptido se libera en el medio mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. La célula de la composición puede ser cualquier célula detallada en el presente documento (por ejemplo, una célula CHO) y el medio de la composición puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, tal como un medio (que puede ser un CDM) que comprenda componentes en el medio como se detalla en la tabla 1 o tabla 1A. Asimismo, el polipéptido de la composición puede ser cualquier polipéptido detallado en el presente documento, tal como un anticuerpo.

En una variación, la composición puede tener un color. En una variación, se determina, mide o evalúa el color mediante el uso de uno o más patrones de color visual. El patrón de color visual puede ser un patrón de color nacional o internacional, tal como, pero sin limitarse al patrón de color de la Farmacopea de los Estados Unidos y al patrón de color de la Farmacopea Europea. Véase USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity. *United States Pharmacopoeia Inc.*, 2000, p. 1926-1927 y Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 2008, 7.^a ed. P.22. Por ejemplo, se puede determinar, medir o evaluar el color de la composición mediante el uso del ensayo de color, opalescencia y coloración (COC). Se entiende que los patrones de referencia para el ensayo de COC pueden ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, marrón (B), amarillo parduzco (BY), amarillo (Y), amarillo verdoso (GY) o rojo (R). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia marrón se les puede dar un valor de patrón de referencia marrón de B1 (el más oscuro), B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo parduzco se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo parduzco de BY1 (el más oscuro), BY2, BY3, BY4, BY5, BY6

o BY7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo de Y1 (el más oscuro), Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 o Y7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia amarillo verdoso se les puede dar un valor de patrón de referencia amarillo verdoso de GY1 (el más oscuro), GY2, GY3, GY4, GY5, GY6 o GY7 (el más claro). A las composiciones que comprenden el polipéptido que se comparan con el patrón de referencia rojo se les puede dar un valor de patrón de referencia rojo de R1 (el más oscuro), R2, R3, R4, R5, R6 o R7 (el más claro). Las composiciones como se detalla en el presente documento pueden tener un valor de patrón de referencia como se describe en la tabla 2 o como se detalla por todo el documento. En una variación particular, una composición como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o 175 mg/ml o 200 mg/ml. En otra variación, una composición como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml. En otra variación, una composición como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml o a aproximadamente 150 mg/ml. Cualquier composición proporcionada en el presente documento puede comprender el polipéptido a una concentración hasta el límite de solubilidad del polipéptido o a una concentración que proporcione una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido cuando se administra a un sujeto. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el polipéptido es eficaz. En otra variación, una composición como se proporciona en el presente documento tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7. También se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o 175 mg/ml o 200 mg/ml y en las que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7. En el presente documento también se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido a una concentración de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml o a aproximadamente 150 mg/ml y en las que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7.

En otro ejemplo, se puede determinar, medir o evaluar el color de la composición mediante el uso de un ensayo cuantitativo, tal como el ensayo de NIFTY o el ensayo de color total. En una variación, los valores numéricos más altos obtenidos mediante el ensayo cuantitativo indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja.

Las composiciones (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas) de los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) producidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se preparan mezclando un polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas. Se describen formulaciones de polipéptido liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de polipéptido acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón histidina-acetato. Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En una variación particular, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o 175 mg/ml o 200 mg/ml. En otra variación, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un

polipéptido a una concentración de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml. En otra variación, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos aproximadamente una cualquiera de 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml o a aproximadamente 150 mg/ml. En una variación, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido producido mediante los procedimientos divulgados en el presente documento se evalúan en cuanto a la intensidad de color usando un ensayo de color, tal como, pero sin limitarse al ensayo de COC, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color mayor de B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9 medido mediante el ensayo de COC. En algunos aspectos, el valor de intensidad de color determinado mediante el ensayo de COC puede ser uno cualquiera de, pero sin limitarse a, B, BY, Y, GY o R, en el que los valores más altos indican una intensidad de color más claro. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos 100 mg/ml, al menos 125 mg/ml o al menos 150 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY). En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color (por ejemplo, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY).

Modos de realización ejemplares

1. Un procedimiento de cultivo de células, que comprende la etapa de poner en contacto las células con un medio de cultivo de células que comprende:
 - de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.
2. El procedimiento del modo de realización 1, que comprende la etapa de poner en contacto las células con un medio de cultivo de células que comprende:
 - cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM;
 - vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μ M a aproximadamente 0,72 μ M;
 - vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μ M a aproximadamente 30,0 μ M;
 - vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μ M a aproximadamente 22,0 μ M; y
 - vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μ M a aproximadamente 1,5 μ M.
3. El procedimiento del modo de realización 1 o 2, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.
4. El procedimiento del modo de realización 3, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de:
 - vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μ M a aproximadamente 14,0 μ M;
 - vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μ M a aproximadamente 72,0 μ M;
 - vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μ M a aproximadamente 44,0 μ M; y
 - vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μ M a aproximadamente 0,14 μ M.

ES 2 716 301 T3

5. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-4, en el que el medio de cultivo de células comprende además una fuente de hierro.
- 5 6. El procedimiento del modo de realización 5, en el que la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso.
7. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-6, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM .
- 10 8. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-7, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM .
9. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-8, en el que el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona.
- 15 10. El procedimiento del modo de realización 9, en el que la concentración de hidrocortisona en el medio de cultivo de células es de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,25 μM .
11. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-10, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido.
- 20 12. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-10, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.
13. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-12, en el que las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento de las células.
- 25 14. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 1-13, en el que las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de producción de las células.
- 30 15. El procedimiento del modo de realización 14, en el que el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células.
16. El procedimiento del modo de realización 15, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 35 17. El procedimiento del modo de realización 15, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
18. El procedimiento del modo de realización 15, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 40 19. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo de células una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que:
- 45 (a) el medio de cultivo de células comprende:
de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;
50 de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2;
de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6;
de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9;
55 de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; y
(b) la célula expresa el polipéptido.
- 60 20. El procedimiento del modo de realización 19, en el que el medio de cultivo de células comprende:
cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM;
vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ;
65 vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ;

ES 2 716 301 T3

- vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y
- 5 vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM .
21. El procedimiento del modo de realización 19 o 20, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.
- 10 22. El procedimiento del modo de realización 21, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de:
- vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM ;
- 15 vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM ;
- vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM ; y
- vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,14 μM .
- 20 23. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-22, en el que el medio de cultivo de células comprende además una fuente de hierro.
24. El procedimiento del modo de realización 23, en el que la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso.
- 25 25. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-24, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM .
26. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-25, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM .
- 30 27. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-26, en el que el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona.
28. El procedimiento del modo de realización 27, en el que la concentración de hidrocortisona en el medio de cultivo de células es de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,25 μM .
- 35 29. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-28, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido.
- 40 30. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-28, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.
31. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-30, en el que el cultivo es durante la fase de crecimiento de la célula.
- 45 32. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-31, en el que el cultivo es durante la fase de producción de la célula.
33. El procedimiento del modo de realización 32, en el que el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células.
- 50 34. El procedimiento del modo de realización 33, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 55 35. El procedimiento del modo de realización 33, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
36. El procedimiento del modo de realización 33, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 60 37. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-36, en el que el polipéptido es un anticuerpo.
38. El procedimiento del modo de realización 37, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
- 65 39. El procedimiento del modo de realización 37 o 38, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF, antimesotelina, anti-PCSK9 o anti-Beta7.

40. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-39, que comprende además la etapa de aislamiento del polipéptido del medio de cultivo de células.
- 5 41. El procedimiento del modo de realización 40, en el que una composición que comprende el polipéptido aislado aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado.
42. El procedimiento del modo de realización 41, en el que la composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos 100 mg/ml.
- 10 43. Un polipéptido producido mediante el procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 19-42.
44. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del modo de realización 43 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 45. Un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, comprendiendo el kit:
- 20 cistina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina en el medio de cultivo de células;
- vitamina B2 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2 en el medio de cultivo de células;
- 25 vitamina B6 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 en el medio de cultivo de células;
- vitamina B9 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 en el medio de cultivo de células; y
- 30 vitamina B12 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.
- 35 46. El kit del modo de realización 45, comprendiendo el kit:
- cistina en una cantidad para proporcionar cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM en el medio de cultivo de células;
- 40 vitamina B2 en una cantidad para proporcionar vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM en el medio de cultivo de células;
- vitamina B6 en una cantidad para proporcionar vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM en el medio de cultivo de células;
- 45 vitamina B9 en una cantidad para proporcionar vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM en el medio de cultivo de células; y
- vitamina B12 en una cantidad para proporcionar vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM en el medio de cultivo de células.
- 50 47. El kit del modo de realización 45 o 46, en el que el kit comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.
- 55 48. El kit del modo de realización 47, en el que el kit comprende además una cualquiera o más de:
- vitamina B1 en una cantidad para proporcionar vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM en el medio de cultivo de células;
- 60 vitamina B3 en una cantidad para proporcionar vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM en el medio de cultivo de células;
- vitamina B5 en una cantidad para proporcionar vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM en el medio de cultivo de células; y
- 65 vitamina B7 en una cantidad para proporcionar vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,14 μM en el medio de cultivo de células.

ES 2 716 301 T3

49. El kit de uno cualquiera de los modos de realización 45-48, en el que el kit comprende además una fuente de hierro.
- 5 50. El kit del modo de realización 49, en el que la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso.
51. El kit de uno cualquiera de los modos de realización 45-50, en el que el kit comprende además hidrocortisona.
52. Un medio de cultivo de células que comprende:
- 10 de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;
de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2;
15 de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6;
de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9; y
de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.
- 20 53. El medio del modo de realización 52, que comprende:
cistina de aproximadamente 0,7 mM a aproximadamente 2,5 mM;
25 vitamina B2 de aproximadamente 0,11 μM a aproximadamente 0,72 μM ;
vitamina B6 de aproximadamente 4,5 μM a aproximadamente 30,0 μM ;
vitamina B9 de aproximadamente 3,4 μM a aproximadamente 22,0 μM ; y
30 vitamina B12 de aproximadamente 0,2 μM a aproximadamente 1,5 μM .
54. El medio del modo de realización 52 o 53, que comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.
- 35 55. El medio del modo de realización 54, que comprende además una cualquiera o más de:
vitamina B1 de aproximadamente 2,0 μM a aproximadamente 14,0 μM ;
40 vitamina B3 de aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 72,0 μM ;
vitamina B5 de aproximadamente 6,8 μM a aproximadamente 44,0 μM ; y
vitamina B7 de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 0,14 μM .
- 45 56. El medio de uno cualquiera de los modos de realización 52-55, en el que el medio de cultivo de células comprende además una fuente de hierro.
- 50 57. El medio del modo de realización 56, en el que la fuente de hierro es citrato férrico o sulfato ferroso.
58. El medio del modo de realización 57, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM .
59. El medio del modo de realización 58, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico a una concentración de desde aproximadamente 11,0 μM a aproximadamente 36,0 μM .
- 55 60. El medio de uno cualquiera de los modos de realización 52-59, en el que el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona.
- 60 61. El medio del modo de realización 60, en el que el medio de cultivo de células comprende hidrocortisona a una concentración de desde aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,25 μM .
62. Un procedimiento de cultivo de células, que comprende la etapa de poner en contacto las células con un medio de cultivo de células que comprende:
- 65 de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;

citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; e

hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM .

5 63. El procedimiento del modo de realización 62, en el que el medio de cultivo de células comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y/o vitamina B12.

10 64. El procedimiento del modo de realización 62 o 63, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2.

65. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-64, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6.

15 66. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-65, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9.

20 67. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-66, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.

68. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-67, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido.

25 69. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-67, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.

70. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-69, en el que las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento de las células.

30 71. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 62-70, en el que las células se ponen en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de producción de las células.

35 72. El procedimiento del modo de realización 71, en el que el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células.

73. El procedimiento del modo de realización 72, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.

40 74. El procedimiento del modo de realización 72, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.

75. El procedimiento del modo de realización 72, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.

45 76. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo de células una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que:

(a) el medio de cultivo de células comprende:

50 de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;

citrato férrico de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 80 μM ; e

55 hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μM a aproximadamente 0,5 μM ; y

(b) la célula expresa el polipéptido.

60 77. El procedimiento del modo de realización 76, en el que el medio de cultivo de células comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y/o vitamina B12.

78. El procedimiento del modo de realización 76 o 77, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2.

65 79. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-78, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6.

ES 2 716 301 T3

80. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-79, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9.
- 5 81. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-80, en el que el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.
82. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-81, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido.
- 10 83. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-81, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido.
84. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-83, en el que el cultivo es durante la fase de crecimiento de la célula.
- 15 85. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-84, en el que el cultivo es durante la fase de producción de la célula.
86. El procedimiento del modo de realización 85, en el que el procedimiento comprende además una etapa de adición de cisteína al medio de cultivo de células.
- 20 87. El procedimiento del modo de realización 86, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 80 mg/l a aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 25 88. El procedimiento del modo de realización 86, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 1500 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
89. El procedimiento del modo de realización 86, en el que se añade la cisteína en una cantidad para proporcionar aproximadamente 140 mg/l de cisteína en el medio de cultivo de células.
- 30 90. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-89, en el que el polipéptido es un anticuerpo.
91. El procedimiento del modo de realización 90, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
- 35 92. El procedimiento del modo de realización 90 o 91, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF, antimesotelina, anti-PCSK9 o anti-Beta7.
93. El procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-92, que comprende además la etapa de aislamiento del polipéptido del medio de cultivo de células.
- 40 94. El procedimiento del modo de realización 93, en el que una composición que comprende el polipéptido aislado aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado.
95. El procedimiento del modo de realización 94, en el que la composición comprende el polipéptido aislado a una concentración de al menos 100 mg/ml.
- 45 96. Un polipéptido producido mediante el procedimiento de uno cualquiera de los modos de realización 76-95.
97. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del modo de realización 96 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 98. Un kit para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, comprendiendo el kit:
- 55 cistina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina en el medio de cultivo de células;
- citrato férrico en una cantidad para proporcionar una concentración de citrato férrico de desde aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M en el medio de cultivo de células; e
- 60 hidrocortisona en una cantidad para proporcionar una concentración de hidrocortisona de desde aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M en el medio de cultivo de células.
- 65 99. El kit del modo de realización 98, en el que el kit comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y/o vitamina B12.

100. El kit del modo de realización 98 o 99, en el que el kit comprende vitamina B2 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2 en el medio de cultivo de células.

5 101. El kit de uno cualquiera de los modos de realización 98-100, en el que el kit comprende vitamina B6 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6 en el medio de cultivo de células.

10 102. El kit de uno cualquiera de los modos de realización 98-101, en el que el kit comprende vitamina B9 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9 en el medio de cultivo de células.

15 103. El kit de uno cualquiera de los modos de realización 98-102, en el que el kit comprende vitamina B12 en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12 en el medio de cultivo de células.

104. Un medio de cultivo de células que comprende:

de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;

20 citrato férrico de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 80 μ M; e

hidrocortisona de aproximadamente 0,05 μ M a aproximadamente 0,5 μ M.

25 105. El medio del modo de realización 104, en el que el medio comprende además vitamina B2, vitamina B6, vitamina B9 y/o vitamina B12.

106. El medio del modo de realización 104 o 105, en el que el medio comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2.

30 107. El medio de uno cualquiera de los modos de realización 104-106, en el que el medio comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6.

35 108. El medio de uno cualquiera de los modos de realización 104-107, en el que el medio comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9.

109. El medio de uno cualquiera de los modos de realización 104-108, en el que el medio comprende de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12.

40 110. Una composición que comprende (a) una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido; y (b) un medio de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 52-61 y 104-109.

111. Una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 52-61 y 104-109.

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar la invención.

Ejemplos

50 Se han identificado medios que producen una especialidad farmacéutica de proteínas con atributos de calidad aceptables, tales como el color, en particular, cuando el producto de proteínas está presente como una solución concentrada (por ejemplo, a una concentración de al menos 100 mg/ml). En algunos aspectos, el producto de proteínas está presente como una composición que comprende al menos 1 mg/ml. Se describen procedimientos de cultivo de células en los medios proporcionados en el presente documento, así como procedimientos de producción de un polipéptido usando los medios. En un aspecto, unos medios pueden comprender cistina y/o cisteína y las vitaminas B2, B6, B9 y B12, con la adición opcional de una fuente de hierro e hidrocortisona. En otro aspecto, unos medios pueden comprender cistina y/o cisteína, hidrocortisona y una fuente de hierro, con la adición opcional de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. Se contemplan, en particular, las composiciones que contienen cistina. Cada uno de los constituyentes en los medios puede estar presente en cualquier valor proporcionado por todo el documento. Los medios pueden ser químicamente definidos o químicamente indefinidos. Los medios pueden reducir la presencia de variantes de carga del polipéptido y/o reducir la presencia de especies reactivas del oxígeno cuando se usan en un procedimiento de producción de polipéptidos en comparación con el polipéptido producido en medios diferentes. Los medios encuentran uso a través de todas las fases del cultivo de células y producción de polipéptidos y se pueden usar en el medio base y/o de alimentación. Se proporciona un polipéptido producido mediante cualquiera de los procedimientos, así como una composición farmacéutica que comprende un polipéptido producido como se detalla en el presente documento. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas comprenden el polipéptido a una concentración de al menos o aproximadamente cualquiera de 100 mg/ml, 125 mg/ml y 150 mg/ml. En otro aspecto,

65

las composiciones farmacéuticas comprenden el polipéptido a una concentración de al menos o aproximadamente cualquiera de 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml. Se contemplan, en particular, el procedimiento de preparación y las composiciones que comprenden anticuerpos. También se describen kits para enriquecer un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos.

Durante el desarrollo del procedimiento de sustancias farmacéuticas, es importante que la calidad del producto cumpla determinados estándares de la industria para su uso en un establecimiento sanitario. Las tendencias recientes hacia la administración subcutánea de anticuerpos monoclonales han requerido un incremento de la concentración de la sustancia farmacéutica formulada a ≥ 100 mg/ml. Sin embargo, a estas concentraciones altas, el color de la sustancia farmacéutica es más intenso, lo que dificulta cumplir las expectativas de calidad establecidas sobre el color del producto. Como se describe en el presente documento, se han identificado varias modificaciones en los medios (ya sean químicamente indefinidos o CDM) que pueden reducir la intensidad de color de la sustancia farmacéutica para cumplir los estándares de calidad del producto.

La línea de células CHO descrita en los ejemplos se genomanipuló para que segregara un anticuerpo humanizado recombinante (denominado en el presente documento anticuerpo monoclonal IgG1) usando un procedimiento de selección con dihidrofolato reductasa (dhfr)/metotrexato similar a un procedimiento descrito previamente en Kaufman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2(11): 1304-1319 (1982). La transfección original usó el sistema de selección con GS con metionina sulfoximina como agente selectivo y medios libres de glutamina. La supertransfección posterior usó el sistema de selección con dhfr y metotrexato como agente selectivo. Antes de iniciar la fase de crecimiento en biorreactores de suspensión agitados de 2 litros, las ampollas congeladas criogénicamente de esta línea de células CHO se descongelaron y cultivaron en medio químicamente definido en matraces de agitación durante al menos dos semanas a 37 °C en una incubadora humidificada con un 5 % de CO₂ para obtener una suspensión de cultivo de células con buenas características de crecimiento y viabilidad.

Ejemplo 1: Intensidad de color presentada en formulaciones que contienen un anticuerpo aislado de líneas de células productoras de anticuerpos.

Una línea de células CHO que podría producir un anticuerpo monoclonal IgG1 (anti-Beta7) se cultivó en peptona que contenía medios químicamente indefinidos. El anticuerpo aislado se purificó y sometió a ensayo en cuanto al color usando el ensayo de claridad, opalescencia y coloración (COC) estándar (Council of Europe. *European Pharmacopoeia.*, 2008, 7.^a ed., p. 22). En resumen, se realizó el ensayo de COC usando tubos idénticos de vidrio neutro, transparente e incoloro, con una base plana y un diámetro interno de 15 mm a 25 mm. Se llenó un tubo hasta una profundidad de 40 mm con una solución de proteínas de 150 g/l preparada a partir de un caldo de cultivo de células purificado y concentrado que contenía el anticuerpo monoclonal IgG1 segregado. El tubo que contenía la solución de anticuerpo se comparó con nueve tubos de referencia, cada uno lleno con una solución de referencia que variaba de B1 (la más oscura) a B9 (la más clara), observando verticalmente con respecto a un fondo blanco en luz natural difusa. La solución de anticuerpo monoclonal IgG1 se midió a un valor de COC de $\leq B5$ (fig. 1; formulación I).

Una línea de células CHO que produce un anticuerpo monoclonal IgG1 (anti-Beta7) se cultivó en CDM. Para la preparación de los medios de células, se prepararon las soluciones con CDM base (medios 1) y con CDM de alimentación (medios 2) combinando los componentes en un único polvo combinado de formulación personalizada que se disolvió en agua y se ajustó a un pH y osmolalidad finales que garantizaron el crecimiento de las células óptimo. Cada uno de los medios base 1 y los medios de alimentación 2 tenía un exceso de 20 componentes, con los componentes de interés enumerados en la tabla A. Algunos componentes en los medios, tales como glucosa, no se combinaron en el polvo combinado, sino que se añadieron por separado durante la preparación de los medios. Para iniciar la fase de crecimiento del cultivo de células, se inocularon células CHO a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en biorreactores agitados de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) que contenían 1 l de medios base 1. Las células se cultivaron en modo de lote alimentado con la adición de 100 ml de los medios de alimentación 2 por litro de caldo de cultivo de células en los días 3, 6 y 9 para el inicio de la fase de producción. La concentración de glucosa se analizaba cada día y, si la concentración de glucosa disminuía por debajo de 3 g/l, se reponía a partir de una solución madre de 500 g/l de glucosa para prevenir la reducción de glucosa. Los reactores estaban equipados con sondas calibradas de oxígeno disuelto, pH y temperatura. El oxígeno disuelto se controló en línea a través de la inyección de aire y/u oxígeno. El pH se controló a través de la adición de CO₂ o Na₂CO₃ y se añadió antiespumante a los cultivos según fue necesario. Los cultivos de células se mantuvieron a pH 7,0 y a una temperatura de 37 °C desde los días 0 a 3, y, a continuación, a 33 °C después del día 3. Los cultivos de células se agitaron a 275 rpm y la concentración de oxígeno disuelto estaba a un 30 % de la saturación del aire. Se supervisó la osmolalidad usando un osmómetro de Advanced Instruments (Norwood, MA). Además, también se determinaron diariamente el pH y las concentraciones de metabolitos fuera de línea usando un Nova Bioprofile 400 (Nova Biomedical, Waltham, MA). Se midieron diariamente la densidad de células viables (VCC) y la viabilidad de las células usando un contador de células automatizado ViCell® (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se usaron tubos de centrifugadora graduados (Kimble Science Products, Fullerton, CA) para medir el hematocrito (PCV) después de la centrifugación de la suspensión de células durante 10 min a 700 x g o a 836 x g. El PCV se expresó como porcentaje del volumen de cultivo total. Al final de la duración del cultivo de células en el día 14, cuando la cantidad de proteína en el cultivo era de aproximadamente 2-10 g/l, se obtuvo el caldo de cultivo de células mediante centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad con proteína A. Después de la purificación, la concentración de proteína en el

conjunto de proteínas A eluido era de aproximadamente 5-10 g/l. El conjunto de proteínas A se concentró además a 150 g/l usando los dispositivos con filtro centrífugo Amicon Centricon (Millipore Corporation, Billerica, MA). El color se midió en el conjunto de proteínas A concentrado usando el ensayo de COC estándar. De forma alternativa, se purificó el caldo de cultivo de células obtenido usando un procedimiento de purificación de anticuerpos estándar, que incluía purificación por afinidad a través de cromatografía de afinidad con proteína A, purificación adicional a través de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, filtración para la eliminación de virus y una etapa final de ultrafiltración y diafiltración para la formulación y concentración finales del anticuerpo antes de la medición del color con el ensayo de COC estándar. Véase Kelley, B. *mAbs.*, 2009, 1(5):443-452. Aunque ligeramente más alta, la medición del color en el conjunto de proteínas A concentrado fue ampliamente indicativa del color esperado en la formulación de anticuerpo final producida mediante el procedimiento de purificación de anticuerpos estándar descrito. El caldo de cultivo de células se obtuvo diariamente para la determinación del valor de anticuerpos centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células antes de su purificación con cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Se realizó el ensayo de COC usando tubos idénticos de vidrio neutro, transparente e incoloro, con una base plana y un diámetro interno de 15 mm a 25 mm. Se llenaron dos tubos, cada uno hasta una profundidad de 40 mm con una solución de proteínas de 150 g/l preparada a partir de un caldo de cultivo de células purificado y concentrado que contenía el anticuerpo monoclonal IgG1 segregado. Cada tubo que contenía la solución de anticuerpo se comparó con nueve tubos de referencia, cada uno lleno con una solución de referencia que variaba desde B1 (la más oscura) a B9 (la más clara), observando verticalmente con respecto a un fondo blanco en luz natural difusa. El análisis del color de las soluciones que contenían un anticuerpo mostró un valor de COC de $\leq B4$ o $\leq B3$ (fig. 1; formulación II y III, respectivamente).

Tabla A. Componentes de interés

Componentes en los medios	Medios 1 (base)	Medios 2 (alimentación)
Sulfato ferroso (μM)	75	0
Vitamina B2 (mg/l)	1,41	10
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	15,42	7
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	60
Vitamina B9 (mg/l)	9,93	197
Vitamina B12 (mg/l)	3,05	48
Cisteína (mg/l)	525	1500
Cistina (mg/l)	0	0
Hidrocortisona (nM)	150	0

Ejemplo 2: La intensidad de color de los anticuerpos aislados de líneas de células productoras de anticuerpos se reduce mediante la alteración de componentes específicos en medios de cultivo de células.

Los medios base 1 y los medios de alimentación 2 se reformularon para contener concentraciones disminuidas de varios nutrientes para su uso en experimentos de cultivo de células para determinar si los medios reformulados podían reducir la intensidad de color del anticuerpo IgG1 monoclonal aislado (anti-Beta7) producido por la línea de células CHO. En resumen, se prepararon las soluciones con CDM base (medios 3) y con CDM de alimentación (medios 4) combinando los componentes en un único polvo combinado de formulación personalizada que se disolvió en agua y se ajustó a un pH y osmolaridad finales que garantizaron un crecimiento de las células óptimo. Cada uno de los medios base 3 y los medios de alimentación 4 tenía un exceso de 20 componentes, con los componentes de interés enumerados en la tabla B. Algunos componentes en los medios, tales como glucosa, no se combinaron en el polvo combinado, sino que se añadieron por separado durante la preparación de los medios. De forma similar, los componentes en los medios que se variaron para este estudio no se incluyeron en los polvos combinados, sino que se añadieron por separado a concentraciones apropiadas durante la preparación de los medios (tabla B). Se añadió citrato férrico a partir de una solución madre de citrato férrico de 5 g/l, se proporcionó vitamina B2 como riboflavina en polvo, se proporcionó vitamina B6 como piridoxina HCl o como piridoxal HCl, se proporcionó vitamina B9 como ácido fólico en polvo, se proporcionó vitamina B12 como cianocobalamina en polvo, se proporcionó cisteína como monoclorhidrato monohidratado de L-cisteína en polvo, se proporcionó cistina como sal disódica monohidratada en polvo y se añadió hidrocortisona a partir de una solución madre 150 μM .

Tabla B. Componentes de interés

Componentes en los medios	Medios 1 (base)	Medios 2 (alimentación)	Medios 3 (base)	Medios 4 (alimentación)
Hierro (μM)	75 ^a	0	18 ^b	0
Vitamina B2 (mg/l)	1,41	10	0,25	0

Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	15,42	7	5,35	0
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	60	0	0
Vitamina B9 (mg/l)	9,93	197	8,61	0
Vitamina B12 (mg/l)	3,05	48	1,76	0
Cisteína (mg/l)	525	1500	0	1500
Cistina (mg/l)	0	0	480	0
Hidrocortisona (nM)	150	0	150	0

^a La fuente de hierro es sulfato ferroso

^b La fuente de hierro es citrato férrico

Para iniciar la fase de crecimiento del cultivo de células, se inocularon células CHO a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en biorreactores agitados de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) que contenían 1 l de medios base 3. Las células se cultivaron en modo de lote alimentado con la adición de 100 ml de los medios de alimentación 4 por litro de caldo de cultivo de células en los días 3, 6 y 9 para el inicio de la fase de producción. La concentración de glucosa se analizaba cada día y, si la concentración de glucosa disminuía por debajo de 3 g/l, se reponía a partir de una solución madre de 500 g/l de glucosa para prevenir la reducción de glucosa. Los reactores estaban equipados con sondas calibradas de oxígeno disuelto, pH y temperatura. El oxígeno disuelto se controló en línea a través de la inyección de aire y/u oxígeno. El pH se controló a través de la adición de CO₂ o Na₂CO₃ y se añadió antiespumante a los cultivos según fue necesario. Los cultivos de células se mantuvieron a pH 7,0 y a una temperatura de 37 °C desde los días 0 a 3, y, a continuación, a 35 °C después del día 3. Los cultivos de células se agitaron a 275 rpm y la concentración de oxígeno disuelto estaba a un 30 % de la saturación del aire. Se supervisó la osmolalidad usando un osmómetro de Advanced Instruments (Norwood, MA). Además, también se determinaron diariamente el pH y las concentraciones de metabolitos fuera de línea usando un Nova Bioprofile 400 (Nova Biomedical, Waltham, MA). Se midieron diariamente la densidad de células viables (VCC) y la viabilidad de las células usando un contador de células automatizado ViCell® (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se usaron tubos de centrifugadora graduados (Kimble Science Products, Fullerton, CA) para medir el hematocrito (PCV) después de la centrifugación de la suspensión de células durante 10 min a 700 x g o a 836 x g. El PCV se expresó como porcentaje del volumen de cultivo total. Al final de la duración del cultivo de células en el día 14, cuando la cantidad de proteína en el cultivo era de aproximadamente 2-10 g/l, se obtuvo el caldo de cultivo de células mediante centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad con proteína A. Después de la purificación, la concentración de proteína en el conjunto de proteínas A eluido era de aproximadamente 5-10 g/l. El conjunto de proteínas A se concentró a 150 g/l usando los dispositivos con filtro centrífugo Amicon Centricon (Millipore Corporation, Billerica, MA). El color se midió en el conjunto de proteínas A concentrado usando el ensayo de COC estándar. El caldo de cultivo de células obtenido también se purificó en paralelo usando un procedimiento de purificación de anticuerpos estándar, que incluía purificación por afinidad a través de cromatografía de afinidad con proteína A, purificación adicional a través de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, filtración para la eliminación de virus y una etapa final de ultrafiltración y diafiltración para la formulación y concentración finales del anticuerpo antes de la medición del color con el ensayo de COC estándar. Véase Kelley, B. *mAbs.*, 2009, 1(5):443-452. Aunque ligeramente más alta, la medición del color en el conjunto de proteínas A concentrado fue ampliamente indicativa del color esperado en la formulación de anticuerpo final producida mediante el procedimiento de purificación de anticuerpos estándar descrito. El caldo de cultivo de células se obtuvo diariamente centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células para la determinación del valor de anticuerpos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Se realizó el ensayo de COC usando tubos idénticos de vidrio neutro, transparente e incoloro, con una base plana y un diámetro interno de 15 mm a 25 mm. Se llenó un tubo hasta una profundidad de 40 mm con una solución de proteínas de 150 g/l preparada a partir de un caldo de cultivo de células purificado y concentrado que contenía el anticuerpo monoclonal IgG1 segregado. El tubo que contenía la solución de anticuerpo se comparó con siete viales de referencia, cada uno lleno con una solución de referencia que variaba desde BY1 (la más oscura) a BY7 (la más clara), en luz natural difusa, observado verticalmente con respecto a un fondo blanco. La solución de anticuerpo monoclonal IgG1 se midió a un valor de COC de \leq BY5 (fig. 1; formulación VII). El hematocrito (PCV) se redujo ligeramente en el cultivo de células cultivado en los medios base 3 y los medios de alimentación 4 en comparación con el cultivo de células cultivado en los medios base 1 y los medios de alimentación 2 (fig. 2A). Esta reducción se correlacionó con una producción de anticuerpos ligeramente reducida (fig. 2B). Un experimento adicional para evaluar el efecto de estos medios sobre el PCV y el valor de anticuerpos confirmó que se redujo el PCV cuando las células se cultivaron con los medios base 3 y los medios de alimentación 4 en comparación con las células cultivadas con los medios base 1 y los medios de alimentación 2 (fig. 2C). Como antes, la reducción del PCV se correlacionó con una producción de anticuerpos reducida (fig. 2D).

Estos resultados demuestran que la intensidad de color del anticuerpo IgG1 monoclonal producido cultivando células CHO con los medios base 3 y los medios de alimentación 4 se reduce en comparación con la intensidad de color del anticuerpo IgG1 monoclonal producido cultivando las células en los medios base 1 y los medios de alimentación 2.

Ejemplo 3: La intensidad de color de los anticuerpos aislados de líneas de células productoras de anticuerpos se reduce mediante la alteración de las concentraciones de vitamina B en medios de cultivo de células.

Para determinar la influencia de los componentes que se variaron en los medios base 3 y los medios de alimentación 4 sobre la intensidad de color del anticuerpo aislado, se variaron las concentraciones de vitamina B2, B6, B9 y B12 mientras que las concentraciones de otros componentes en los medios se mantuvieron constantes. Los medios se prepararon como se describe en el ejemplo 2. Los componentes en los medios que se variaron para este estudio no se incluyeron en los polvos combinados, sino que se añadieron por separado a concentraciones apropiadas durante la preparación de los medios. Los medios base 5 se formularon para tener concentraciones reducidas de vitamina similares a los medios base 3 y todos los demás componentes similares a los medios base 1 (tabla C). Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base 5 para la fase de crecimiento inicial y en los días 3, 6 y 9 se cultivó con los medios de alimentación 2 o los medios de alimentación 4. Las mediciones de la viabilidad de las células y el aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal se realizaron como se describe en el ejemplo 2. Después de la purificación de anticuerpos, también se determinaron la intensidad de color y los valores de anticuerpos como se describe en el ejemplo 2. La solución de anticuerpo monoclonal IgG1 obtenida de células cultivadas con los medios base 5 y los medios de alimentación 2 se midió a un valor de COC de \leq B4 (fig. 1; formulación V). La solución de anticuerpo monoclonal IgG1 obtenida de células cultivadas con los medios base 5 y los medios de alimentación 4 se midió a un valor de COC de \leq B4 (fig. 1; formulación IV).

Tabla C. Medios con concentraciones reducidas de vitamina B2, B6, B9 y B12

Componentes en los medios	Medios 5 (base)
Sulfato férrico (μ M)	75
Vitamina B2 (mg/l)	0,25
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	5,35
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0
Vitamina B9 (mg/l)	8,61
Vitamina B12 (mg/l)	1,76
Cisteína (mg/l)	525
Cistina (mg/l)	0
Hidrocortisona (nM)	150

Se realizó un estudio factorial completo para evaluar la contribución de los componentes individuales de vitamina B (vitamina B2, B6, B9 y B12) a la intensidad de color del anticuerpo aislado. Aunque la concentración de vitamina B2 se trató como un factor separado, las concentraciones de piroxidina y piridoxal se combinaron conjuntamente en un factor único como vitamina B6, de tal manera que se varió simultáneamente la concentración de estos dos nutrientes. De forma similar, se variaron conjuntamente las concentraciones de las vitaminas B9 y B12 como un factor único, de tal manera que se varió simultáneamente la concentración de estos dos nutrientes. Se prepararon varias formulaciones de los medios, incluyendo los medios enumerados en las tablas D, E y F. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base 5 y los medios de alimentación 4, los medios base 6 y los medios de alimentación 7, los medios base 8 y los medios de alimentación 9, o los medios base 10 y los medios de alimentación 11 en modo de lote alimentado. Se alimentaron cultivos de células adicionales con medios base que contenían 1,41 mg/l de vitamina B2 y/o 15,42 mg/l de vitamina B6 (suministrada como piridoxina) y medios de alimentación que contenían 10 mg/l de vitamina B2 y/o 76 mg/l de vitamina B6 (7 mg/l de piridoxina y 60 mg/l de piridoxal). Las mediciones de la viabilidad de las células y el aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal se realizaron como se describe en el ejemplo 2. Después de la purificación de anticuerpos, se determinaron los valores de anticuerpos como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Para este ensayo de color, denominado en el presente documento el ensayo de intensidad de fluorescencia normalizada (NIFTY), se analizaron aproximadamente de 50 a 125 μ g de muestras de anticuerpo monoclonal mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna G3000SWXF (TOSOH), con un caudal isocrático de 0,5 ml/min. La fase móvil para SEC fue fosfato de potasio 0,2 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH 6,2. La temperatura de la columna se controló a 15 °C. Se supervisó el eluyente de SEC en cuanto a la absorción UV a 280 nm y en cuanto a la fluorescencia con una longitud de onda de excitación a 350 nm y una longitud de onda de emisión a 425 nm. Los picos de SEC de las especies de anticuerpo monoclonales se integraron usando el programa informático Agilent Chemstation en relación con la absorbancia UV y con los cromatogramas de emisión de fluorescencia. Para cada muestra de anticuerpo monoclonal, se determinó la fluorescencia normalizada dividiendo el área de pico de fluorescencia del pico principal entre el área de pico de absorbancia UV del pico principal, que corrigió la respuesta de fluorescencia por la contribución de masa de anticuerpo. El valor de intensidad de color se determinó posteriormente calculando la proporción de la fluorescencia normalizada de la muestra de anticuerpo monoclonal de prueba con respecto a la de una muestra de anticuerpo monoclonal de referencia que contenía una lectura de COC de \leq B5. El análisis del hematocrito con el tiempo (IVPCV) y los niveles de valores de anticuerpos con el programa informático estadístico JMP 8.0.2 demostró que, aunque la viabilidad de

las células y los niveles de valores de anticuerpos solo se vieron ligeramente afectados por la alteración de las concentraciones de vitamina B2 y vitamina B6 tanto en los medios base como de alimentación (fig. 3A y B; línea de tendencia central), las concentraciones incrementadas de estas dos vitaminas en los medios de cultivo de células incrementaron significativamente la intensidad de color en el anticuerpo aislado (fig. 4; línea de tendencia central). Por el contrario, las concentraciones incrementadas de vitamina B9 y vitamina B12 no afectaron significativamente a la viabilidad de las células, a los niveles de valores de anticuerpos o a la intensidad de color (fig. 3 y 4; línea de tendencia central). Adicionalmente, se observaron niveles bajos de intensidad de color en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían 0,25 mg/l de vitamina B2 y 5,35 mg/l de vitamina B6 (suministrada como piridoxina) y medios de alimentación libres de vitamina B2 y vitamina B6.

También se investigó el efecto de las vitaminas B1, B3, B5 y B7; sin embargo, el efecto de estos nutrientes sobre la intensidad de color de las soluciones que contenían un anticuerpo no fue significativo.

Tabla D. Medios con variación de vitamina B2

Componentes en los medios	Medios 6 (base)	Medios 7 (alimentación)
Sulfato ferroso (μM)	75	0
Vitamina B2 (mg/l)	1,41	10
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	5,35	0
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	0
Vitamina B9 (mg/l)	8,61	0
Vitamina B12 (mg/l)	1,76	0
Cisteína (mg/l)	525	1500
Cistina (mg/l)	0	0
Hidrocortisona (nM)	150	0

Tabla E. Medios con variación de vitamina B6

Componentes en los medios	Medios 8 (base)	Medios 9 (alimentación)
Hierro (μM)	75	0
Vitamina B2 (mg/l)	0,25	0
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	15,42	7
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	60
Vitamina B9 (mg/l)	8,61	0
Vitamina B12 (mg/l)	1,76	0
Cisteína (mg/l)	525	1500
Cistina (mg/l)	0	0
Hidrocortisona (nM)	150	0

Tabla F. Medios con variación de vitamina B9 y B12

Componentes en los medios	Medios 10 (base)	Medios 11 (alimentación)
Hierro (μM)	75	0
Vitamina B2 (mg/l)	0,25	0
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	5,35	0
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	0
Vitamina B9 (mg/l)	9,93	197
Vitamina B12 (mg/l)	3,05	48
Cisteína (mg/l)	525	1500
Cistina (mg/l)	0	0
Hidrocortisona (nM)	150	0

Ejemplo 4: La intensidad de color de los anticuerpos aislados de líneas de células productoras de anticuerpos

se reduce mediante la alteración de la fuente y las concentraciones de hierro en medios de cultivo de células

Para evaluar la contribución de las concentraciones de hierro a la intensidad de color del anticuerpo aislado, se varió la concentración de hierro, mientras que las concentraciones de otros componentes en los medios se mantuvieron constantes. Los medios se prepararon como se describe en el ejemplo 2. Los componentes en los medios que se variaron para este estudio no se incluyeron en los polvos combinados, sino que se añadieron por separado a concentraciones apropiadas durante la preparación de los medios. Los medios base 1 se reformularon para tener concentraciones reducidas de sulfato ferroso a fin de producir los medios base 12 que contenían sulfato ferroso 18 μM y los medios base 13 que contenían sulfato ferroso 10 μM . Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base 1 y los medios de alimentación 2, los medios base 12 y los medios de alimentación 2 o los medios base 13 y los medios de alimentación 2 en modo de lote alimentado. Las mediciones de la viabilidad de las células y el aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal se realizaron como se describe en el ejemplo 2. Después de la purificación de anticuerpos, se determinaron los valores de anticuerpos como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Este ensayo de color, también denominado el ensayo de NIFTY, se implementó como se describe en el ejemplo 3. El análisis del hematocrito con el tiempo (IVPCV) y los niveles de valores de anticuerpos con el programa informático estadístico JMP 8.0.2 demostró que, aunque la viabilidad de las células y los niveles de valores de anticuerpos se redujeron con niveles de concentraciones más bajas de hierro en comparación con el hierro a una concentración de 75 μM (fig. 5A y B), una concentración más baja de hierro en los medios de cultivo de células disminuyó significativamente la intensidad de color en el anticuerpo aislado (fig. 5C).

Para investigar si el efecto observado de las condiciones de cultivo de células sobre el color se debía a fenómenos intracelulares o extracelulares, se realizaron una serie de experimentos de incubación *in vitro*. Se agregó una cantidad de 1 g/l del anticuerpo monoclonal en medio de cultivo de células recién preparado y se incubó a 33 °C durante hasta seis días. Los medios de cultivo de células usados para la incubación *in vitro* tenían una concentración de sulfato ferroso de 10, 18 y 75 μM . Las concentraciones de vitamina B se mantuvieron constantes a las concentraciones reducidas de 0,25 mg/l de vitamina B2, 5,35 mg/l de vitamina B6 (5,35 mg/l de piridoxina + 0 mg/l de piridoxal), 8,61 mg/l de vitamina B9, y 1,76 mg/l de vitamina B12. Se tomó una muestra de la mezcla incubada en los días 0, 3 y 6 y el anticuerpo se purificó por medio de cromatografía con proteína A. La solución que contenía un anticuerpo aislado se midió en cuanto a la intensidad de color con el ensayo de NIFTY. Se observó un incremento de la intensidad de color desde 1,0 unidades en el día 0 a 1,8, 1,44 o 1,27 unidades en el día 6 en soluciones que contenían un anticuerpo aisladas de células cultivadas en medios que contenían sulfato ferroso 75, 18 o 10 μM , respectivamente (fig. 5D). La formación de color incrementada a concentraciones más altas de hierro reflejó los resultados de los experimentos de cultivo de células que indicaban que los mecanismos extracelulares desempeñaban un papel en la coloración del anticuerpo.

Para evaluar además la contribución del hierro a la intensidad de color del anticuerpo aislado, se variaron la fuente y la concentración de hierro mientras que las concentraciones de otros componentes en los medios se mantuvieron constantes. Los medios se prepararon como se describe en el ejemplo 2. Los componentes en los medios que se variaron para este estudio no se incluyeron en los polvos combinados, sino que se añadieron por separado a concentraciones apropiadas durante la preparación de los medios. Los medios base 1 se reformularon para tener concentraciones reducidas de sulfato ferroso a fin de producir los medios base 12 que contenían sulfato ferroso 18 μM y los medios base 13 que contenían sulfato ferroso 10 μM . Adicionalmente, los medios base 1 se reformularon para tener concentraciones reducidas de hierro, así como fuentes de hierro diferentes a fin de producir los medios base 14 que contenían nitrato férrico 18 μM , los medios base 15 que contenían citrato férrico 18 μM y los medios base 16 que contenían citrato férrico 10 μM . Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base 1 y los medios de alimentación 2, los medios base 12 y los medios de alimentación 2, los medios base 13 y los medios de alimentación 2, los medios base 14 y los medios de alimentación 2, los medios base 15 y los medios de alimentación 2 o los medios base 16 y los medios de alimentación 2 en modo de lote alimentado. Las mediciones de la viabilidad de las células y el aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal se realizaron como se describe en el ejemplo 2. Después de la purificación de anticuerpos, también se determinaron los valores de anticuerpos como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Este ensayo de color, también denominado el ensayo de NIFTY, se implementó como se describe en el ejemplo 3. El análisis del hematocrito con el tiempo (IVPCV) y los niveles de valores de anticuerpos con el programa informático estadístico JMP 8.0.2 demostró que la viabilidad de las células y los niveles de valores de anticuerpos se redujeron con niveles de concentraciones más bajas de sulfato ferroso en comparación con el sulfato ferroso a una concentración de 75 μM (fig. 6A y B). La viabilidad de las células y los niveles de valores de anticuerpos del cultivo de células usando medios que contenían citrato férrico 18 μM fueron comparables a los medios que contenían sulfato ferroso 75 μM (fig. 6A y B). Sin embargo, el uso de citrato férrico 18 μM en los medios de cultivo de células disminuyó significativamente la intensidad de color en el anticuerpo aislado en comparación con el sulfato ferroso a todas las concentraciones sometidas a prueba (fig. 6C). La viabilidad de las células, los valores de anticuerpos y el color del anticuerpo aislado del cultivo de células cultivado en medios que contenían nitrato férrico 18 μM fue comparable a los observados con el uso de medios que contenían sulfato ferroso 10 μM o 18 μM (fig. 6A-C).

Las concentraciones reducidas de vitamina B y las concentraciones reducidas de hierro se combinaron para probar si los efectos beneficiosos sobre el color debidos a las vitaminas y el hierro eran aditivos. Los medios 13, los medios 14, los medios 15 y los medios 16 base se reformularon para tener niveles reducidos de concentraciones de vitamina B a fin de producir los medios 21, los medios 22, los medios 23 y los medios 25 base, respectivamente. Adicionalmente, los medios base 1 se reformularon para tener concentraciones reducidas de vitamina B y nitrato férrico 10 µM como fuente de hierro a fin de producir los medios base 24. Las concentraciones reducidas de vitamina para los medios 21 a 25 fueron como sigue: 0,25 mg/l de vitamina B2, 5,35 mg/l de vitamina B6 (5,35 mg/l de piridoxina + 0 mg/l de piridoxal), 8,61 mg/l de vitamina B9 y 1,76 mg/l de vitamina B12. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base 21, 22, 23, 24 o 25 y con los medios de alimentación 2 en modo de lote alimentado. El aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal y la medición de los valores de anticuerpos se realizaron como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se midió con el ensayo de NIFTY. El análisis de los niveles de valores de anticuerpos y la intensidad de color demostró que cuando la concentración de sulfato ferroso se redujo desde 75 µM a 18 µM y se combinó con concentraciones más bajas de vitamina, el color y el valor resultantes fueron más bajos que cuando se redujo solo uno de los factores (fig. 6D y E, signos más). Sin embargo, no parecía haber ningún beneficio adicional en la reducción de la concentración de hierro desde 18 µM a 10 µM para el nitrato férrico o bien para el sulfato ferroso (fig. 6D y E, signos más).

Para investigar la contribución de las especies reactivas del oxígeno (ERO) a la intensidad de color del anticuerpo, se realizaron experimentos *in vitro* agregando una muestra de 2 g/l de anticuerpo IgG1 monoclonal a un vial que contenía medios de cultivo de células enriquecidos con sulfato ferroso 75 µM o 18 µM. Se realizaron experimentos *in vitro* adicionales agregando una muestra de 2 g/l de anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a un vial que contenía medios de cultivo de células enriquecidos con 1,41 mg/l de vitamina B2 o 0,25 mg/l de vitamina B2. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 días sin ninguna célula en ausencia o presencia de 203 U/ml de catalasa. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Este ensayo de color, también denominado el ensayo de NIFTY, se implementó como se describe en el ejemplo 3. El análisis de los niveles de color con el programa informático estadístico JMP 8.0.2 demostró que, aunque las concentraciones incrementadas de hierro incrementaban la intensidad de color de la solución de anticuerpo (fig. 7A), este incremento del color se reducía mediante la adición de catalasa (fig. 7B; línea de tendencia central). Por el contrario, aunque las concentraciones incrementadas de vitamina B2 incrementaban la intensidad de color de la solución de anticuerpo, la intensidad de color no se reducía mediante la adición de catalasa (fig. 7A y B; línea de tendencia central).

Ejemplo 5: La formación de variantes de carga ácidas de anticuerpos aislados de líneas de células productoras de anticuerpos se reduce mediante la alteración de componentes específicos en medios de cultivo de células.

Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron con una de tres soluciones de medios base 1 reformulados, conteniendo cada una sulfato ferroso 10 µM, 18 µM o bien 75 µM. Se alimentaron cultivos de células adicionales (es decir, se cultivaron) con una de dos soluciones de medios base 3 reformulados, conteniendo cada una citrato férrico 10 µM o bien 18 µM. Se alimentaron todos los cultivos de células con medios de alimentación libres de hierro en modo de lote alimentado. El aislamiento del anticuerpo IgG1 monoclonal y la determinación de los valores de anticuerpos se realizaron como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. Este ensayo de color, también denominado el ensayo de NIFTY, se implementó como se describe en el ejemplo 3. Para la detección de variantes de carga ácidas del anticuerpo en la solución purificada, se analizó la heterogeneidad de carga de los anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) usando una columna Dionex ProPac WCX-10 (4x250 mm). El análisis se realizó en un sistema de HPLC Agilent 1100 con el efluente supervisado a 280 nm. La fase móvil A fue fosfato de sodio 25 mM (pH 6,6) y la fase móvil B fue sulfato de sodio 150 mM en la fase móvil A. Se empleó un gradiente lineal de B del 0 al 37 % en 45 minutos con un caudal de 0,5 ml/min. La temperatura de la columna se controló a 40 °C. Se eliminaron los residuos de lisina C terminal en las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales mediante la carboxipeptidasa B antes del análisis por IEC para reducir la complejidad de la heterogeneidad de carga en la región básica. El análisis de la intensidad de color como una relación con respecto a la presencia de variantes de carga ácidas usando el programa informático estadístico JMP 8.0.2 mostró una fuerte correlación entre la intensidad de color alta y las concentraciones incrementadas de variantes de carga ácidas en la solución de anticuerpo (fig. 8A). Además, la presencia de variantes de carga ácidas se redujo significativamente en los anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con los medios 3 modificados y los medios 4 en comparación con las líneas de células cultivadas con los medios modificados 1 y los medios 2, observándose la mayor reducción en las concentraciones más bajas de hierro (fig. 8A).

Se examinó la correlación entre la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en soluciones que contenían un anticuerpo obtenidas de líneas de células cultivadas con medios que contenían concentraciones variables de hierro o vitamina B. Se produjeron anticuerpos IgG1 monoclonales a partir de células CHO cultivadas en medios base que contenían sulfato ferroso 18 µM o 75 µM o en medios base que contenían concentraciones bajas, medias o altas de vitamina B, mientras se mantenía la concentración de hierro a 18 µM. Las concentraciones bajas de vitamina fueron como sigue: 0,25 mg/l de vitamina B2, 5,35 mg/l de vitamina B6 (5,35 mg/l de piridoxina + 0 mg/l de

piridoxal), 8,61 mg/l de vitamina B9 y 1,76 mg/l de vitamina B12. Las concentraciones medias de vitamina fueron como sigue: 0,70 mg/l de vitamina B2, 7,7 mg/l de vitamina B6 (7,7 mg/l de piridoxina + 0 mg/l de piridoxal), 4,9 mg/l de vitamina B9 y 1,5 mg/l de vitamina B12. Las concentraciones altas de vitamina fueron como sigue: 1,41 mg/l de vitamina B2, 15,42 mg/l de vitamina B6 (15,42 mg/l de piridoxina + 0 mg/l de piridoxal), 9,93 mg/l de vitamina B9 y 3,05 mg/l de vitamina B12. El aislamiento de los anticuerpos IgG1 monoclonales y la determinación de los valores de anticuerpos se realizaron como se describe en el ejemplo 2. La intensidad de color se determinó usando el ensayo de color total. Para el ensayo de color total, se derivó un valor cuantitativo del color relativo de las muestras usando el sistema de medición del color CIE como se describe en Berns *et al.*, *Billmeyer and Saltzman's Principles of Color Technology*, 3.^a edición. Nueva York, NY, John Wiley & Sons, Inc., (2000). En resumen, después de calibrar con agua, se midió el espectro de absorción de una muestra de prueba sin diluir en la región visible (380-780 nm) usando un espectrofotómetro HP8453A (cubeta de longitud de paso de 1 cm). A continuación, se convirtió el espectro de absorción a la escala de colores CIE L*a*b* como se describe previamente en *Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates*, Annual Book of ASTM Standards, vol. 06.01, (2011). Para estos cálculos se usó un espectro plano artificial en la región visible como iluminante. El "color total" representaba la delta E, que se correspondía con la distancia euclidiana entre la muestra de prueba y el agua en el espacio de color CIE L*a*b* tridimensional. Además, el "color total" representaba el color global de la muestra de anticuerpo monoclonal de prueba sin diferenciar entre tonos distintos. El valor de intensidad de color se determinó posteriormente calculando la proporción de la medición del "color total" de la muestra de anticuerpo monoclonal de prueba con respecto a la de una muestra de anticuerpo monoclonal de referencia que contenía una lectura de COC de $\leq B5$. Se observó una correlación positiva entre la concentración incrementada de hierro y la intensidad de color incrementada (fig. 8B). Además, las concentraciones incrementadas de hierro dieron como resultado concentraciones incrementadas de variantes de carga ácidas. En comparación, la variación simultánea de las concentraciones de vitamina B2, B6, B9 y B12 en los medios que contenían una concentración constante de hierro no mostró ninguna correlación entre las variantes de carga ácidas y la intensidad de color (fig. 8C).

Se examinó la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían concentraciones variables de B2 y B6. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, el cultivo de células se alimentó con los medios base y de alimentación que contenían concentraciones variables de vitamina B2 y B6 en modo de lote alimentado. Los anticuerpos se aislaron posteriormente y se midieron en cuanto a la intensidad de color usando el ensayo de NIFTY como se describe en el ejemplo 3, además de la presencia de variantes de carga ácidas. El análisis de la intensidad de color como una relación con respecto a la presencia de variantes de carga ácidas usando el programa informático estadístico JMP 8.0.2 mostró una fuerte correlación entre la intensidad de color alta y las concentraciones incrementadas de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían 1,41 mg/l de vitamina B2 y/o 15,42 mg/l de vitamina B6 (suministrada como piridoxina) y medios de alimentación que contenían 10 mg/l de vitamina B2 y/o 76 mg/l de vitamina B6 (7 mg/l de piridoxina y 60 mg/l de piridoxal) (fig. 9A y B). Se observaron los niveles más bajos de intensidad de color y variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían 0,25 mg/l de vitamina B2 y 5,35 mg/l de vitamina B6 (suministrada como piridoxina) y medios de alimentación libres de vitamina B2 y vitamina B6 (fig. 9A y B).

Se realizó un estudio factorial completo para determinar la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían concentraciones variables de piridoxal en presencia de fuentes de hierro diferentes. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron con medios base y de alimentación que contenían concentraciones variables de piridoxal. Se proporcionaron citrato férrico o sulfato ferroso en los medios base y se realizó el procedimiento de cultivo de células en modo de lote alimentado. Los anticuerpos se aislaron posteriormente y se midieron en cuanto a la intensidad de color usando el ensayo de color total, además de la presencia de variantes de carga ácidas. El análisis de la intensidad de color como una relación con respecto a la presencia de variantes de carga ácidas usando el programa informático estadístico JMP 8.0.2 mostró una fuerte correlación entre la intensidad de color más alta y las concentraciones incrementadas de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían 0 mg/l de piridoxal con sulfato ferroso 18 μ M y medios de alimentación que contenían 0 mg/l o 60 mg/l de piridoxal en comparación con anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían 0 mg/l de piridoxal con citrato férrico 18 μ M y medios de alimentación que contenían 0 mg/l o 60 mg/l de piridoxal (fig. 10A y B).

Se examinó la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían concentraciones variables de vitamina B2, B6, B9 y B12 en presencia de fuentes de hierro diferentes. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron con unos medios base que contenían 1,41 mg/l de vitamina B2, 15,42 mg/l de piridoxina, 0 mg/l de piridoxal, 9,93 mg/l de vitamina B9 y 3,05 mg/l de vitamina B12, y uno de tres medios de alimentación diferentes, conteniendo cada uno concentraciones variables de las vitaminas B2, B6, B9 y B12. Se proporcionaron citrato férrico o sulfato ferroso en los medios base y se realizó el procedimiento de cultivo de células en modo de lote alimentado. Los anticuerpos se aislaron posteriormente y se midieron en cuanto a la intensidad de color, usando el ensayo de color total, además de la presencia de variantes de carga ácidas. El análisis de la intensidad de color como una relación con respecto a la presencia de variantes de carga ácidas usando el programa

informático estadístico JMP 8.0.2 mostró una intensidad de color reducida en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de alimentación que contenían 5 mg/l de vitamina B2, 3,5 mg/l de piridoxina, 30 mg/l de piridoxal, 98,5 mg/l de vitamina B9 y 24 mg/l de vitamina B12 en presencia de sulfato ferroso 18 μ M o bien citrato férrico 18 μ M en comparación con medios de alimentación que contenían 10 mg/l de vitamina B2, 7 mg/l de piridoxina, 60 mg/l de piridoxal, 197 mg/l de vitamina B9 y 48 mg/l de vitamina B12 (fig. 11A; concentración de vitamina 2 y concentración de vitamina 3, respectivamente). La mayor reducción de la intensidad de color se observó en anticuerpos aislados de células cultivadas con medios de alimentación que carecían de vitamina B2, B6, B9 y B12 (fig. 11A; concentración de vitamina 1). Aunque existió una reducción significativa de la intensidad de color del anticuerpo con concentraciones disminuidas de vitamina B2, B6, B9 y B12, los resultados preliminares indicaron que no existió ningún cambio significativo en la presencia de variantes de carga ácidas (fig. 11B).

Se examinó la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían concentraciones crecientes de hierro de fuentes diferentes. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron con los medios base 1 que contenían sulfato ferroso 75 μ M, los medios base 12 que contenían sulfato ferroso 18 μ M o los medios base 13 que contenían sulfato ferroso 10 μ M en modo de lote alimentado. Se alimentaron cultivos de células adicionales con los medios base 15 que contenían citrato férrico 18 μ M o los medios base 16 que contenían citrato férrico 10 μ M. Se alimentaron todos los cultivos de células con medios de alimentación libres de hierro en modo de lote alimentado. La intensidad de color se determinó usando el ensayo de NIFTY como se describe en el ejemplo 3. La mayor reducción de la intensidad de color se observó en los anticuerpos aislados de células cultivadas con los medios base que contenían concentraciones reducidas de hierro (fig. 12A). La intensidad de color reducida se correlacionó con una presencia reducida de variantes de carga ácidas en la solución de anticuerpo aislado (fig. 12B).

Se examinó la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían una concentración creciente de citrato férrico. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron en los medios base 1 modificados o los medios base 3 modificados que contenían cada uno citrato férrico 18 μ M o citrato férrico 36 μ M. Se alimentaron todos los cultivos de células con medios de alimentación libres de hierro en modo de lote alimentado. El anticuerpo IgG1 monoclonal se aisló de los cultivos de células incubados a 33 °C o 37 °C. La intensidad de color se determinó con un ensayo de color, específicamente el ensayo de color total, en el que los valores numéricos más altos indican una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indican una intensidad de color más baja. La mayor reducción de la intensidad de color se observó en los anticuerpos aislados de células cultivadas con los medios base que contenían concentraciones reducidas de citrato férrico (fig. 13A). La intensidad de color reducida se correlacionó con una presencia reducida de variantes de carga ácidas en la solución de anticuerpo aislado. Los anticuerpos aislados de células cultivadas a 33 °C mostraron la mayor reducción de las variantes de carga ácidas (fig. 13B). El incremento de la temperatura desde 33 °C a 37 °C dio como resultado un incremento significativo de la producción de anticuerpos de aproximadamente 2500 mg/l a 4250 mg/l por las células productoras de anticuerpos cultivadas en los medios base 1 modificados o bien los medios base 3 modificados.

Los medios base 3 se reformularon para contener 525 mg/l de cisteína en lugar de 480 mg/l de cistina para su uso en experimentos de cultivo de células para determinar la contribución de la cisteína a la intensidad de color del anticuerpo IgG1 monoclonal aislado (anti-Beta7) producido por la línea de células CHO. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal a partir de células CHO, las células se cultivaron en los medios base 3 modificados que contenían 525 mg/l de cisteína y los medios de alimentación 4 en modo de lote alimentado. Los anticuerpos se aislaron y se midió el color usando el ensayo de COC estándar. Se realizó el ensayo de COC usando tubos idénticos de vidrio neutro, transparente e incoloro, con una base plana y un diámetro interno de 15 mm a 25 mm. Se llenaron dos tubos, cada uno hasta una profundidad de 40 mm con una solución de proteínas de 150 g/l preparada a partir de un caldo de cultivo de células purificado y concentrado que contenía el anticuerpo monoclonal IgG1 segregado. Cada tubo que contenía la solución de anticuerpo se comparó con siete viales de referencia, cada uno lleno con una solución de referencia que variaba desde BY1 (la más oscura) a BY7 (la más clara) o bien con nueve viales de referencia, cada uno lleno con una solución de referencia que variaba desde B1 (la más oscura) a B9 (la más clara), en luz natural difusa, observado verticalmente con respecto a un fondo blanco. El análisis del color de las soluciones que contenían un anticuerpo mostró un valor de COC de \leq B5 o \leq BY5 (fig. 1; formulación VI y VIII, respectivamente). La formulación de anticuerpo VI se sometió a ensayo adicionalmente en cuanto a la intensidad de color usando el ensayo de color total como se describe anteriormente y el ensayo de NIFTY como se describe en el ejemplo 3. El análisis del color de la formulación de anticuerpo mostró un valor de intensidad de color de 0,71 y 1,00 cuando se midió con el ensayo de NIFTY y el ensayo de color total, respectivamente. Esta formulación de anticuerpo era de color más claro en comparación con la intensidad de color en la formulación de anticuerpo III (descrita en el ejemplo 1) y en la formulación de anticuerpo IV (descrita en el ejemplo 3). La formulación de anticuerpo III mostró un valor de intensidad de color de 1,59 y 2,61 cuando se midió con el ensayo de NIFTY y el ensayo de color total, respectivamente. La formulación de anticuerpo IV mostró un valor de intensidad de color de 1,47 y 2,04 cuando se midió con el ensayo de NIFTY y el ensayo de color total, respectivamente.

Se realizó un estudio multivariante para determinar la correlación de la intensidad de color y la formación de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios de células que contenían

concentraciones variables de vitaminas B2, B6, B9 y B12 en presencia o ausencia de cistina o cisteína, y en presencia o ausencia de hidrocortisona. Para la producción del anticuerpo IgG1 monoclonal (anti-Beta7) a partir de células CHO, las células se cultivaron en medios base que contenían 1,41 mg/l de vitamina B2, 15,42 mg/l de piridoxina, 0 mg/l de piridoxal, 9,93 mg/l de vitamina B9 y 3,05 mg/l de vitamina B12 o en medios base que contenían 0,7 mg/l de vitamina B2, 7,7 mg/l de piridoxina, 0 mg/l de piridoxal, 4,9 mg/l de vitamina B9 y 1,5 mg/l de vitamina B12. Además, los medios base contenían 525 mg/l de cisteína o bien 480 mg/l de cistina (tabla G). Se prepararon medios base adicionales como en la tabla G y se enriquecieron con hidrocortisona 150 nM. Se alimentaron todos los cultivos de células con medios de alimentación libres de hierro en modo de lote alimentado.

10 Tabla G. Experimento multivariante sobre los componentes

Componentes en los medios	Medios 17 (base)	Medios 18 (base)	Medios 19 (base)	Medios 20 (base)
Vitamina B2 (mg/l)	1,41	1,41	0,7	0,7
Vitamina B6/ piridoxina (mg/l)	15,42	15,42	7,7	7,7
Vitamina B6/ piridoxal (mg/l)	0	0	0	0
Vitamina B9 (mg/l)	9,93	9,93	4,9	4,9
Vitamina B12 (mg/l)	3,05	3,05	1,5	1,5
Cisteína (mg/l)	525	0	525	0
Cistina (mg/l)	0	480	0	480

Se aisló el anticuerpo IgG1 monoclonal de cultivos de células y se midió en cuanto a la intensidad de color, así como en cuanto a la presencia de variantes de carga ácidas. La intensidad de color se determinó usando el ensayo de color total como se describe anteriormente. El análisis de la intensidad de color como una relación con respecto a la presencia de variantes de carga ácidas usando el programa informático estadístico JMP 8.0.2 mostró una correlación entre la intensidad de color reducida y las concentraciones disminuidas de variantes de carga ácidas en anticuerpos aislados de líneas de células cultivadas con medios base que contenían cistina en comparación con cisteína (fig. 14A y B). Además, la reducción de las concentraciones de vitamina B también dio como resultado una intensidad de color y formación de variantes de carga ácidas disminuidas con la adición de hidrocortisona, lo que potenció la reducción (fig. 14A y B).

Ejemplo 6: La intensidad de color del anticuerpo IgG1 monoclonal aislado de una línea de células se redujo mediante la alteración de componentes específicos en medios de cultivo de células.

El efecto reductor de la intensidad de color de la cistina cuando se usó en un medio de cultivo de células base se investigó además con una línea de células CHO que produjo un anticuerpo IgG1 monoclonal diferente (mAb10). Esta línea de células se cultivó en medios base indefinidos con el aminoácido cisteína en forma de monómero a una concentración de 2,6 mM (cisteína) o bien en forma de dímero a una concentración de 1,3 mM (cistina). La producción del mAb10 se inició en cultivo de células inoculando células en el medio base indefinido y se añadió un medio de alimentación de lote en el día 3 durante un ciclo de cultivo de células de 14 días en un biorreactor. Las células se cultivaron a 37 °C en el día 1 y se inició un cambio de temperatura durante el transcurso del ciclo de cultivo de células. Se obtuvieron los medios y el mAb10 se recuperó como una composición antes de la evaluación de la intensidad de color con el ensayo de COC. Las composiciones que comprendían mAb10 recuperado de células cultivadas en medios base que contenían cisteína aparecían como un líquido incoloro o ligeramente coloreado con un valor de intensidad de color de B7 determinado mediante el ensayo de COC. Una composición que comprendía mAb10 recuperado de células cultivadas en medios base donde la cisteína se reemplazó por cistina apareció como un líquido incoloro o ligeramente coloreado con un valor de COC de intensidad de color mejorado de B8.

En un estudio multivariante, se usaron cuatro protocolos diferentes para la producción de mAb10 a partir de células CHO para evaluar el efecto de determinados componentes en los medios sobre la intensidad de color de una composición que comprendía el anticuerpo recuperado del cultivo de células (tabla H). Las concentraciones de hierro, así como de la fuente de hierro, en los medios base de cultivo de células indefinidos difirieron entre los protocolos. Las concentraciones de vitamina B y el aminoácido cisteína en forma de monómero (cisteína) o en forma de dímero (cistina) en los medios base indefinidos también difirieron entre los protocolos. La producción del mAb10 se inició en cultivo de células inoculando células en medio base indefinido y se añadió un medio de alimentación de lote en el día 3 durante un ciclo de cultivo de células de 14 días en un biorreactor. Se obtuvieron los medios y el mAb10 se recuperó como una composición antes de la evaluación de la intensidad de color con el ensayo de COC. El análisis de la intensidad de color de las composiciones que comprendían mAb recuperado demostró que los protocolos 1, 2 y 3 daban como resultado una composición de anticuerpo con intensidad de color reducida (valor de COC de B7) en comparación con la intensidad de color de la composición de anticuerpo obtenida con el protocolo 4 (valor de COC de B6). Estos resultados demostraron que el uso de cistina en lugar de cisteína en el medio base, concentraciones reducidas de vitamina B y/o hierro reducido, así como un cambio en la fuente de hierro daban como resultado la reducción de la intensidad de color en las composiciones de mAb10 (tabla H). Por ejemplo, en el protocolo 3 en

comparación con el protocolo 4, la reducción de las concentraciones de vitamina B y la sustitución de citrato férrico con sulfato ferroso a una concentración más baja redujo la intensidad de color de la composición de anticuerpo sin la necesidad de cambiar el uso de cisteína por cistina. Se observó el mismo efecto sobre la reducción de la intensidad de color en el protocolo 2 frente al protocolo 4, cuando se sustituyó citrato férrico con sulfato ferroso a una concentración más baja y se sustituyó cistina con cisteína sin alteración de las concentraciones de vitamina B. La reducción de las concentraciones de vitamina B, la reducción de la concentración de hierro y el cambio de la fuente de hierro, así como el uso de cistina en lugar de cisteína como se observa en el protocolo 1, también redujeron la intensidad de color de una composición de mAb10 en comparación con una composición de mAb10 obtenida del protocolo 4 (tabla H).

Tabla H. Resumen de los componentes en los medios base

Componente	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
Hierro (µM)	25 % ^a	50 % ^a	50 % ^a	100 % ^b
Vitamina B1 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
Vitamina B2 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
Vitamina B3 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
vitamina B5 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
vitamina B6 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
vitamina B7 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
vitamina B9 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
vitamina B12 (µM)	25 %	100 %	50 %	100 %
Cisteína	0 mM	0 mM	2,6 mM	2,6 mM
Cistina	1,3 mM	1,3 mM	0 mM	0 mM
Valor de COC	B7	B7	B7	B6

^a indica citrato férrico como fuente de hierro; ^b indica sulfato ferroso como fuente de hierro

Ejemplo 7: El ensayo de NIFTY y el ensayo de color total son comparables al ensayo de COC estándar para la medición de la intensidad de color en soluciones que contienen un anticuerpo.

El reciente énfasis sobre las formulaciones a concentraciones altas ha incrementado, en general, la intensidad de color de las formulaciones líquidas de anticuerpo monoclonal. El color se considera un atributo de calidad del producto y, en consecuencia, es importante que se supervise de cerca el color de la sustancia farmacéutica en cuanto a su consistencia mientras se desarrollan e implementan cambios en el procedimiento. Uno de los problemas a los que se hace frente para medir el color es el uso de ensayos apropiados. Aunque sea el estándar de la industria, el ensayo de COC no es completamente cuantitativo y es vulnerable al juicio subjetivo de la persona que realiza el ensayo. Para superar este problema, se desarrollaron y usaron dos procedimientos diferentes para la medición del color, el ensayo de color total y el ensayo de NIFTY, como se describe en los ejemplos, para medir la intensidad de color.

La correlación entre estos tres ensayos de medición del color se determinó representando los valores de color total en la abscisa, los valores de NIFTY en la ordenada y con los puntos de datos en base a las mediciones de COC reales realizadas en soluciones que contenían un anticuerpo medidas mediante los ensayos de color total y de NIFTY (fig. 15A). Existió una buena correlación entre las mediciones cuantitativas de los ensayos de color total y los ensayos de NIFTY ($R^2=0,75$). Además, se pudo observar que estos ensayos se correlacionaron razonablemente bien con las mediciones de COC reales, lo que indica que los resultados de los ensayos de color total y de NIFTY fueron indicadores útiles de la intensidad de color de las muestras.

Se obtuvieron y purificaron anticuerpos a partir del cultivo de células mediante dos procedimientos diferentes antes de la medición de la intensidad de color. En un procedimiento, el anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad con proteína A. Después de la purificación, la concentración de proteína en el conjunto de proteínas A eluido era de aproximadamente 5-10 g/l. El conjunto de proteínas A se concentró además a 150 g/l usando los dispositivos con filtro centrífugo Amicon Centricon. El color se midió en el conjunto de proteínas A concentrado usando el ensayo de COC estándar, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY. En el otro procedimiento, se purificó el caldo de cultivo de células obtenido usando un procedimiento de purificación de anticuerpos estándar, que incluía purificación por afinidad a través de cromatografía de afinidad con proteína A, purificación adicional a través de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, filtración para la eliminación de virus y una etapa final de ultrafiltración y diafiltración para la formulación y concentración finales del anticuerpo antes de la medición del color con el ensayo de COC estándar, el ensayo de color total o el ensayo de NIFTY.

Debido a consideraciones prácticas, se decidió usar el color del conjunto de proteínas A como representante del color de la sustancia farmacéutica final en varios de los experimentos descritos en los ejemplos. Se evaluó el valor predictivo

de la intensidad de color medida en las formulaciones de anticuerpo preparadas a partir del conjunto de proteínas A en cuanto a la intensidad de color que se obtendría de una formulación de anticuerpo completamente purificado final. La comparación de la intensidad de color medida mediante el ensayo de NIFTY (fig. 15B) o el ensayo de color total (fig. 15C) en soluciones que contenían un anticuerpo obtenidas del conjunto de proteínas A frente a la formulación de anticuerpo completamente purificado final mostró una correlación razonablemente buena para las mediciones del color total ($R^2=0,73$) y las mediciones de NIFTY ($R^2=0,98$). El color total se deriva del espectro de absorbancia del conjunto y de ahí que se pueda esperar una intensidad de color más alta en los conjuntos anteriores en curso debido a la presencia de impurezas distintas a anticuerpos o debido a la dispersión incrementada de la luz. Por el contrario, los valores de NIFTY se miden desde el pico principal del cromatograma de exclusión por tamaño y de ahí que se pudiera esperar que fueran constantes a través del procedimiento de purificación si las moléculas de proteínas coloreadas o no coloreadas no se purificaran preferencialmente. En conjunto, se observaron correlaciones razonables entre las mediciones del color entre los conjuntos de proteínas A y la sustancia farmacéutica formulada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende la etapa de cultivar en un medio de cultivo de células una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido, en el que:
 - a) el medio de cultivo de células comprende:
 - de aproximadamente 200 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l de vitamina B2;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 10,0 mg/l de vitamina B6;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 12,0 mg/l de vitamina B9;
 - de aproximadamente 0,05 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l de vitamina B12; y
 - citrato férrico o sulfato ferroso;
 - b) la célula expresa el polipéptido; y
 - c) el polipéptido se aísla del medio de cultivo de células, en el que el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 100 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que a) el medio de cultivo de células comprende de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 1200 mg/l de cistina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo de células comprende:
 - cistina de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 2,5 mM;
 - vitamina B2 de aproximadamente 0,11 µM a aproximadamente 0,72 µM;
 - vitamina B6 de aproximadamente 4,5 µM a aproximadamente 30,0 µM;
 - vitamina B9 de aproximadamente 3,4 µM a aproximadamente 22,0 µM; y
 - vitamina B12 de aproximadamente 0,2 µM a aproximadamente 1,5 µM.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 a 3, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5 y vitamina B7.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el medio de cultivo de células comprende además una cualquiera o más de:
 - vitamina B1 de aproximadamente 2,0 µM a aproximadamente 14,0 µM;
 - vitamina B3 de aproximadamente 11,0 µM a aproximadamente 72,0 µM;
 - vitamina B5 de aproximadamente 6,8 µM a aproximadamente 44,0 µM; y
 - vitamina B7 de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 0,14 µM.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el medio de cultivo de células comprende citrato férrico o sulfato ferroso a una concentración de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 80 µM.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el medio de cultivo de células comprende además hidrocortisona, opcionalmente a una concentración de desde aproximadamente 0,05 µM a aproximadamente 0,25 µM.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido es un anticuerpo, opcionalmente en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF, antimesotelina, anti-PCSK9 o anti-Beta7.
- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 125 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.
- 10 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido aislado se concentra para proporcionar una composición que comprende un polipéptido a una concentración de al menos 150 mg/ml y en el que la composición tiene un valor de patrón de referencia de color seleccionado de uno cualquiera de B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 y R4-R7 de acuerdo con los patrones de color de la Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia, 2008, 7.^a edición, página 22.
- 15 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se determina el color del polipéptido aislado mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en el ensayo de COC, el ensayo de color total y el ensayo de NIFTY.
- 20

Figura 1

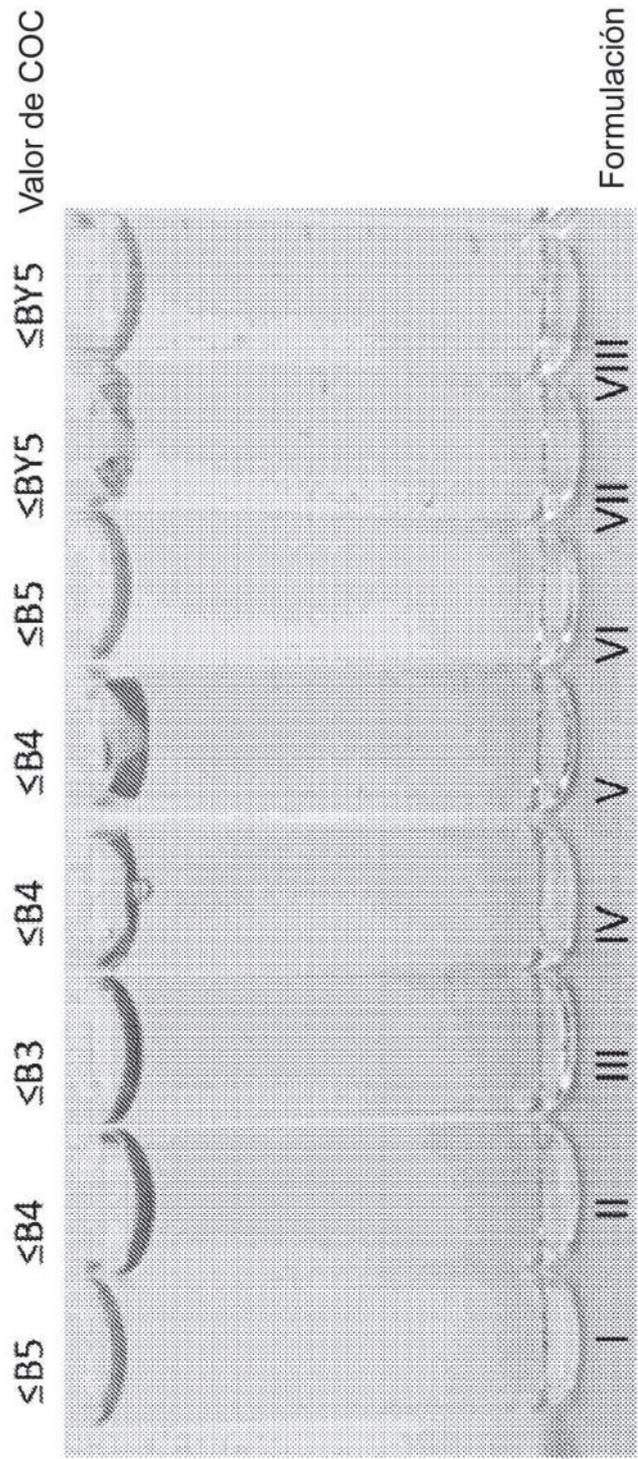


Figura 2

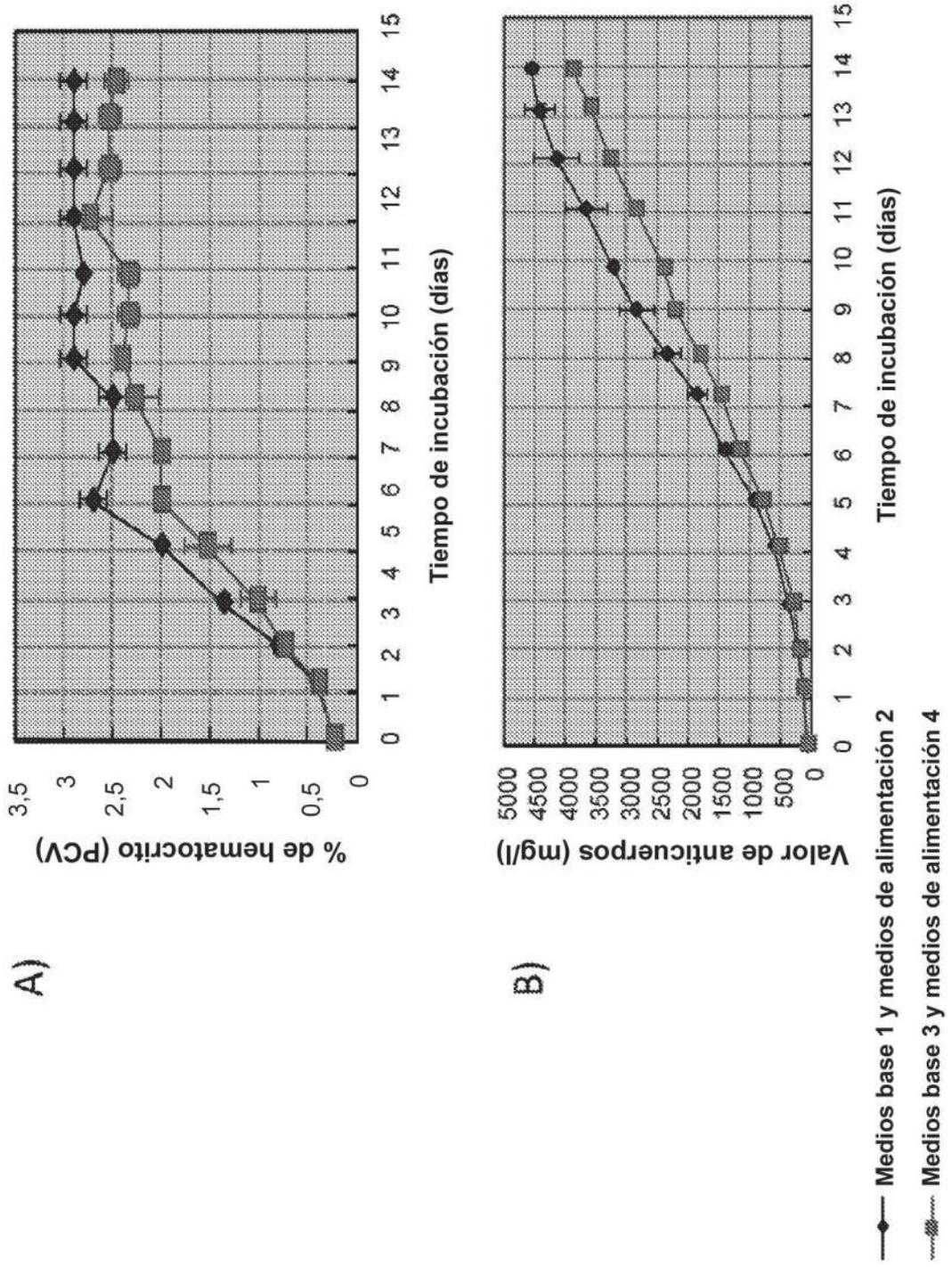


Figura 2

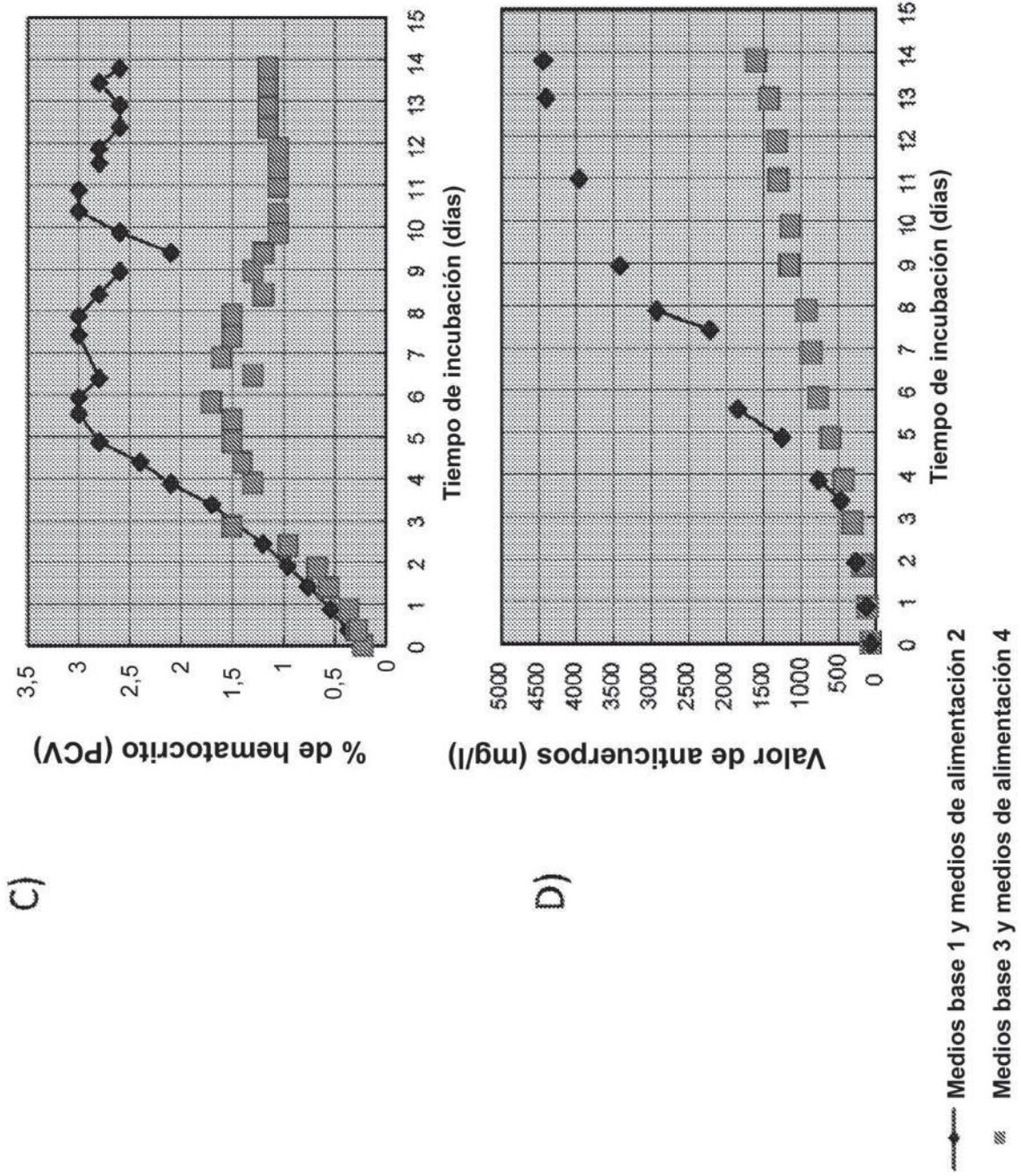
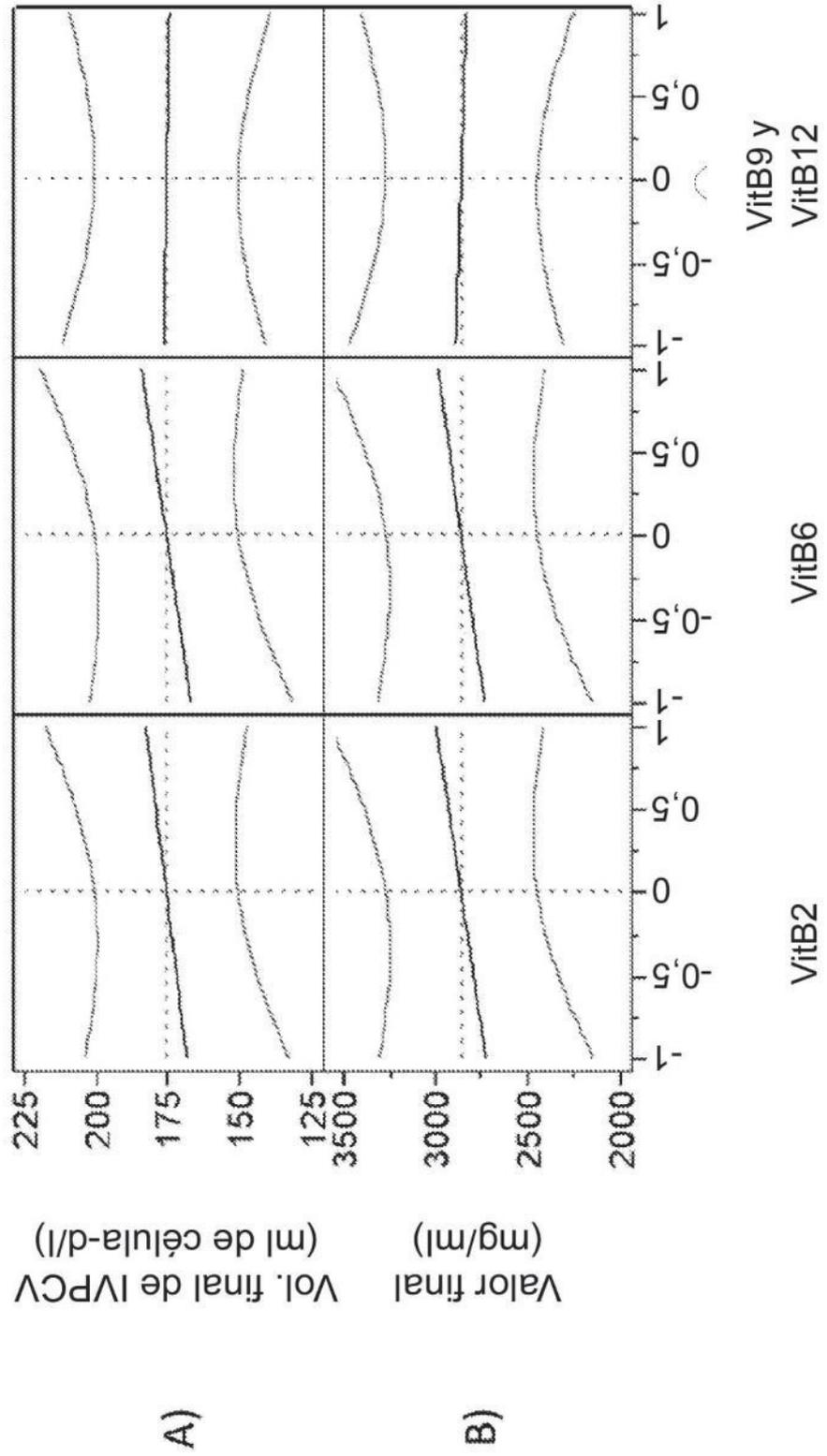


Figura 3



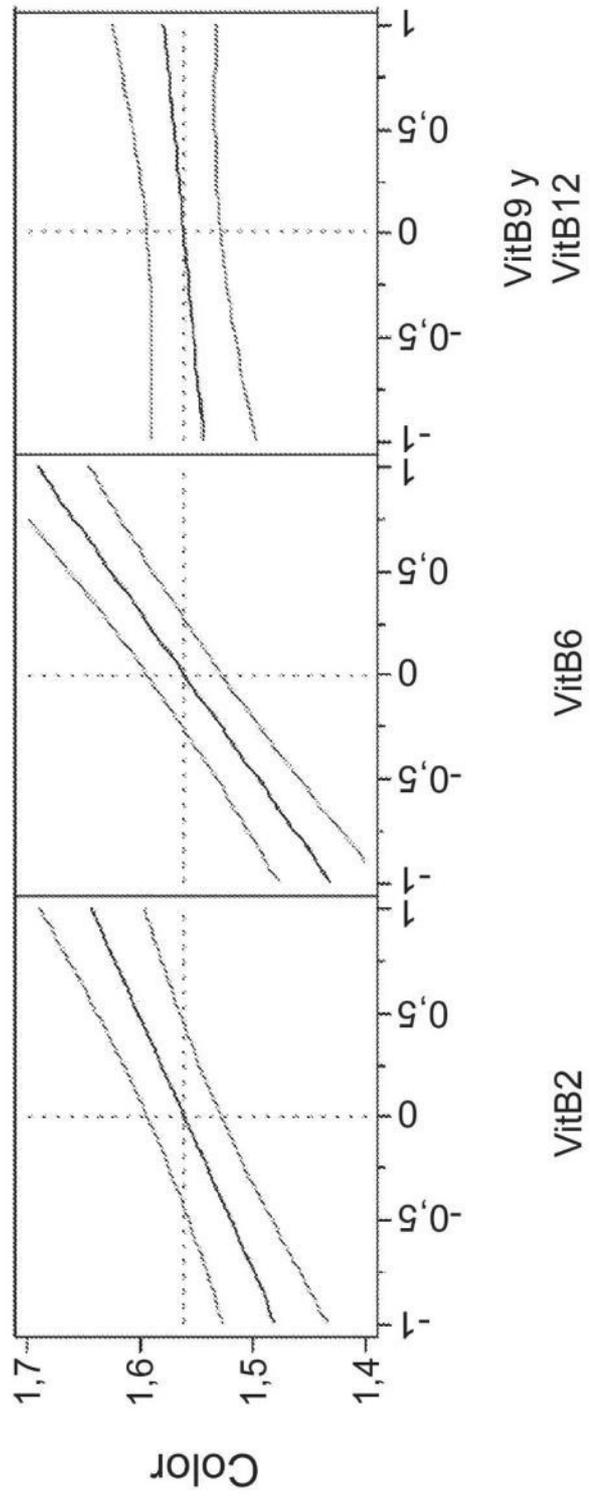


Figura 4

Figura 5

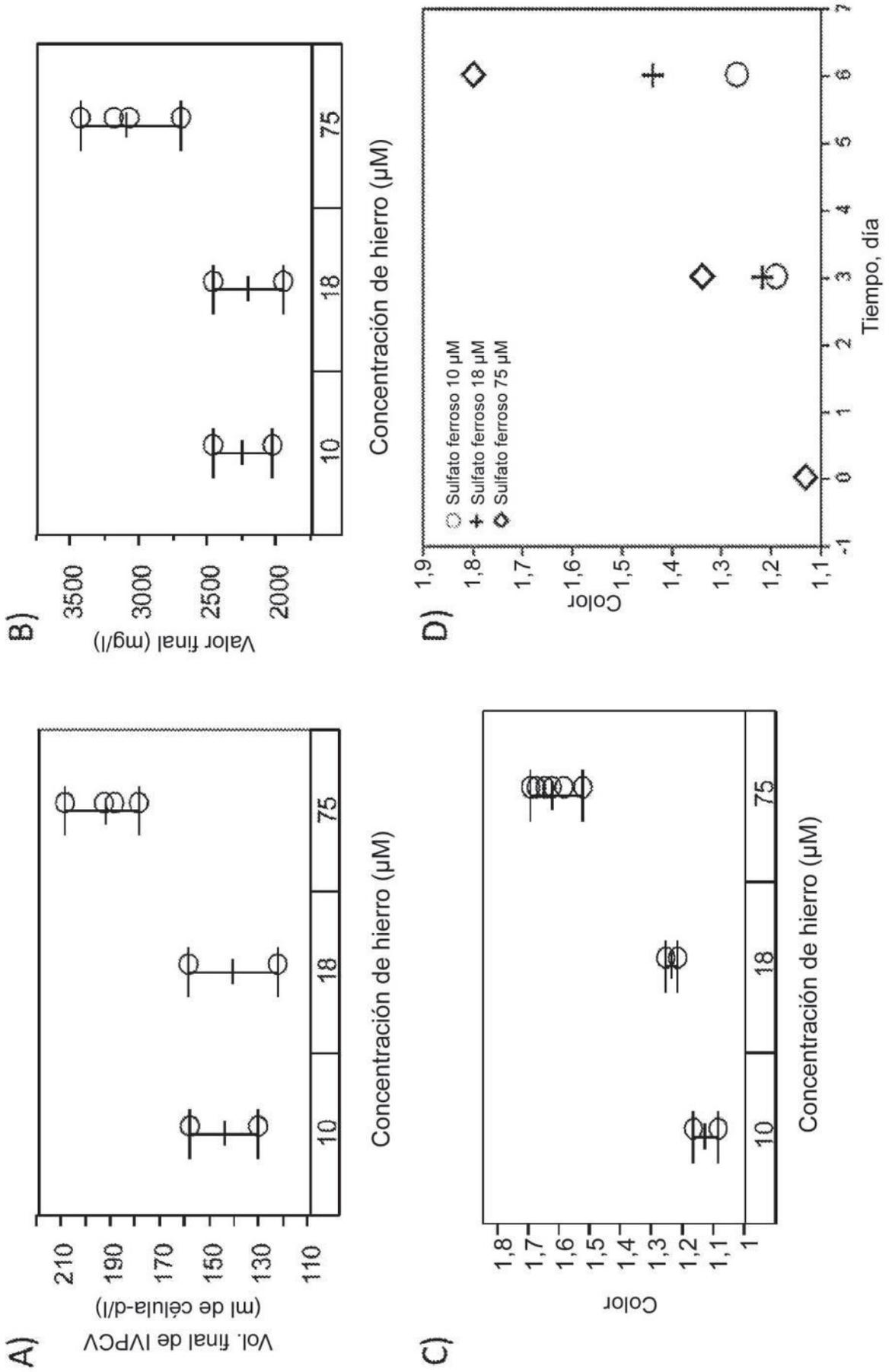


Figura 6

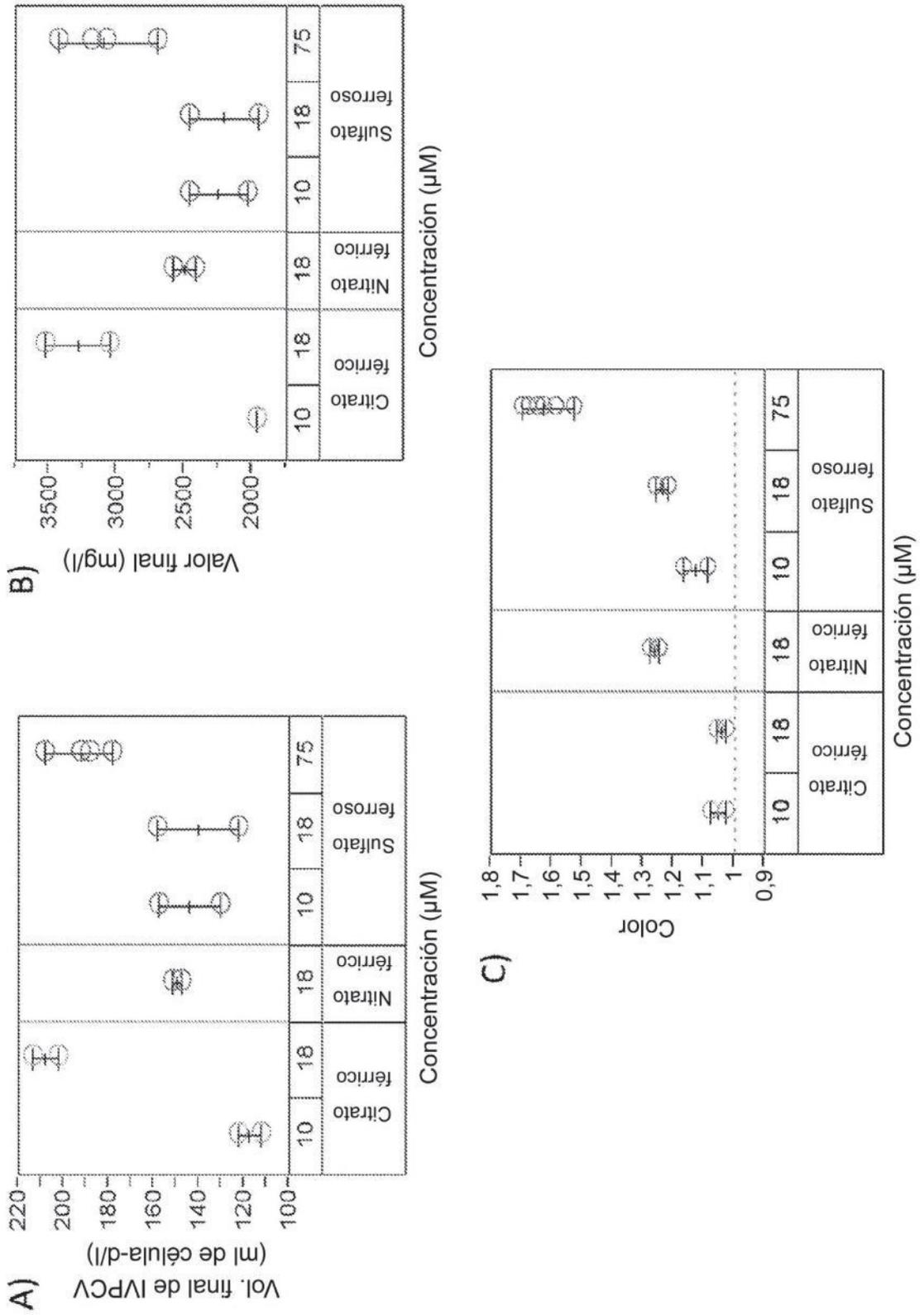


Figura 6

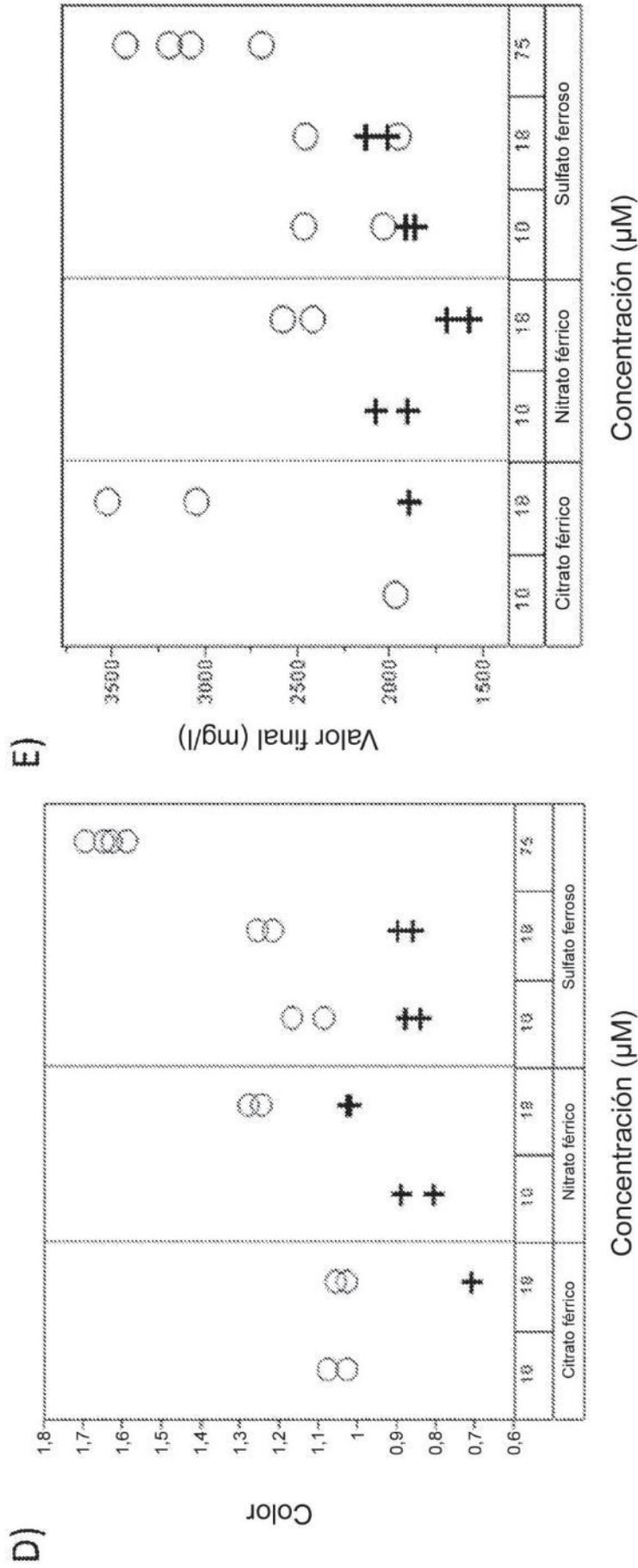


Figura 7

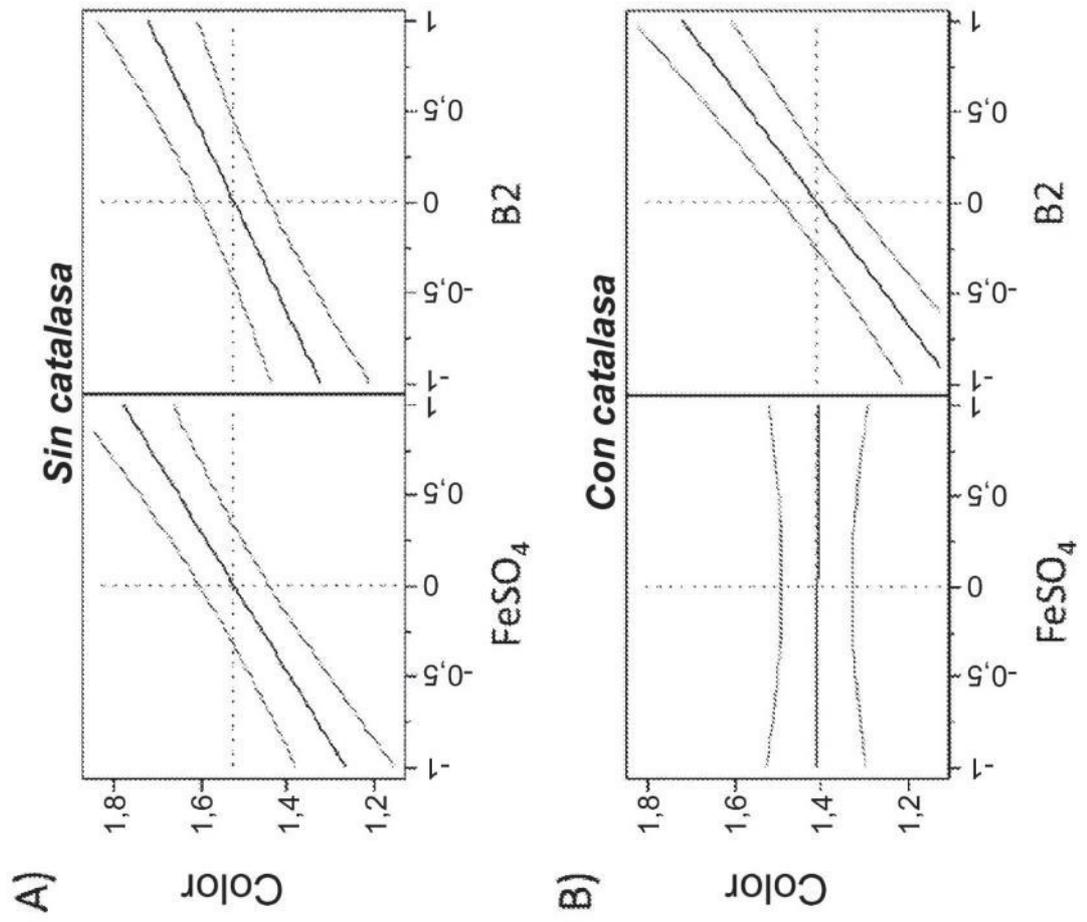


Figura 8

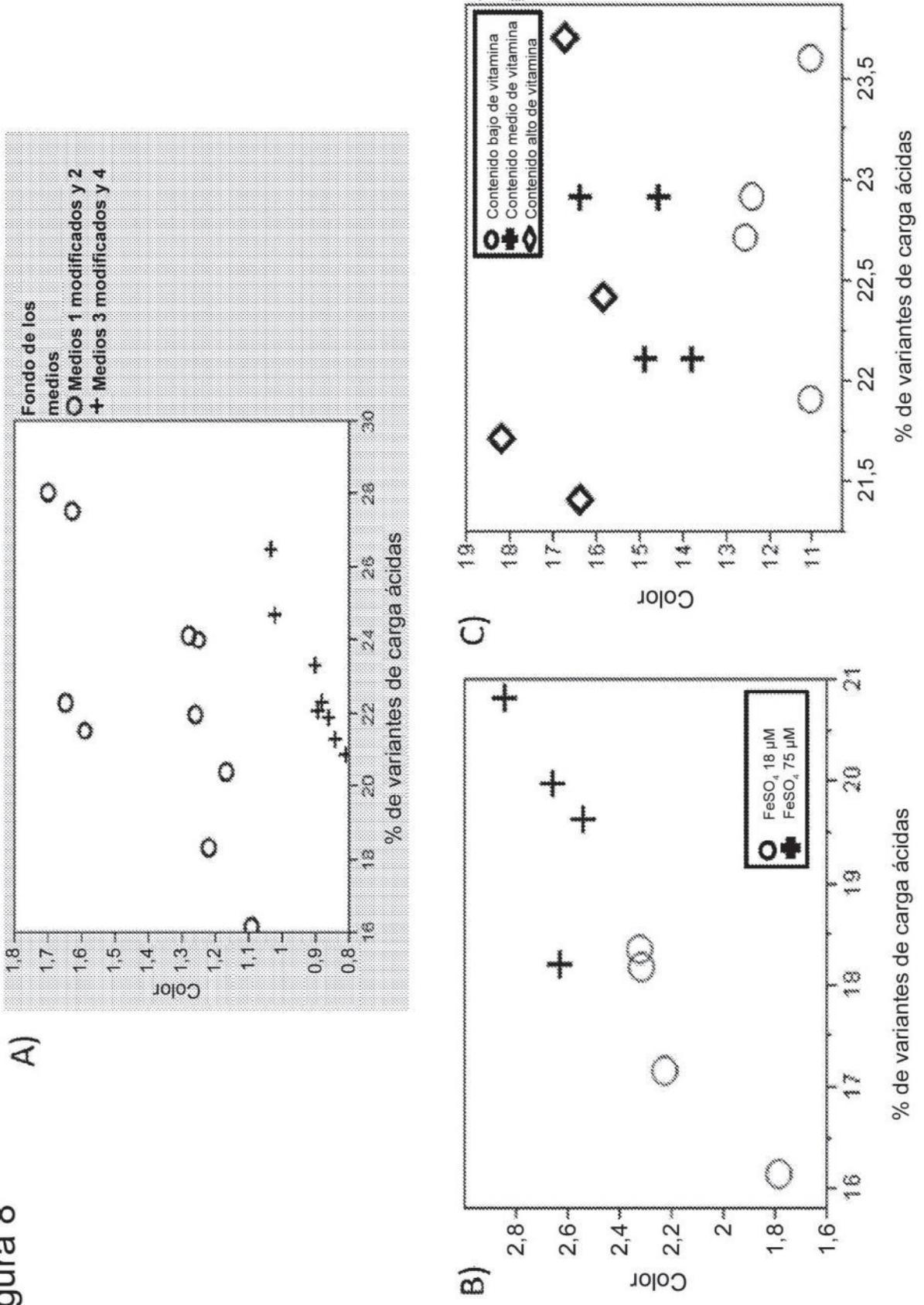


Figura 9

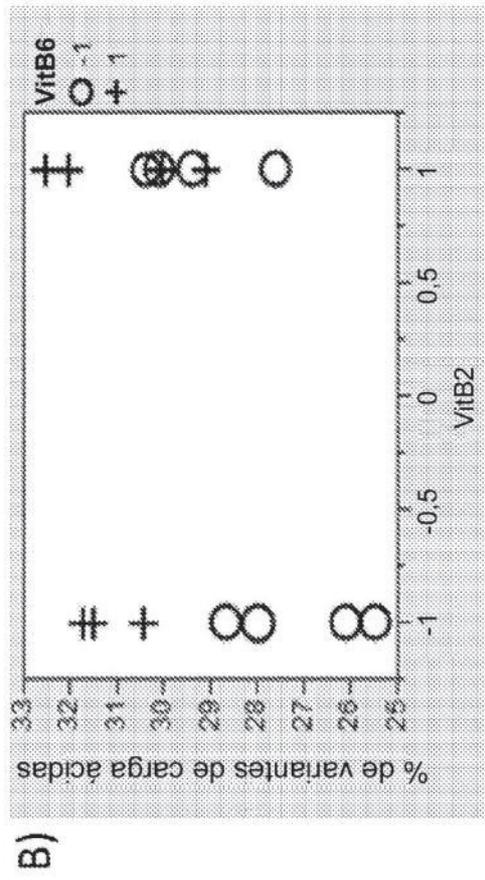
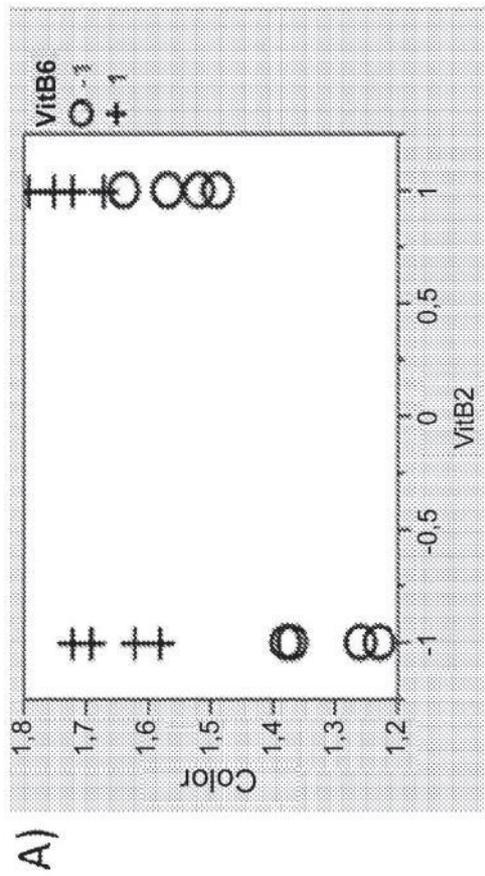


Figura 10

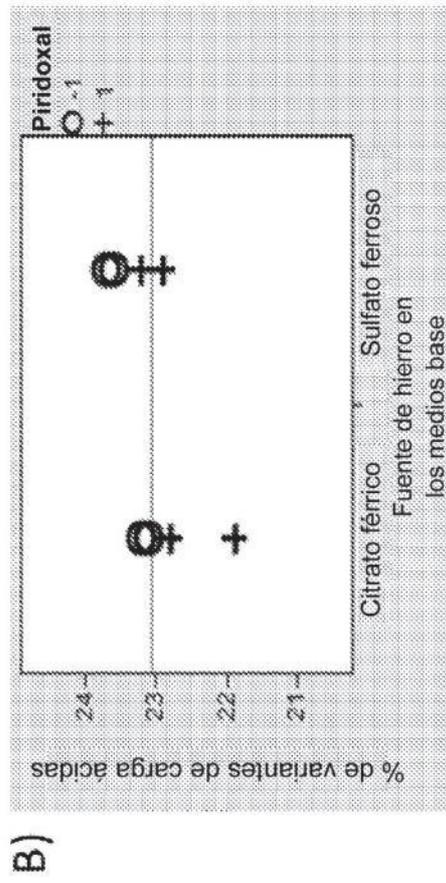
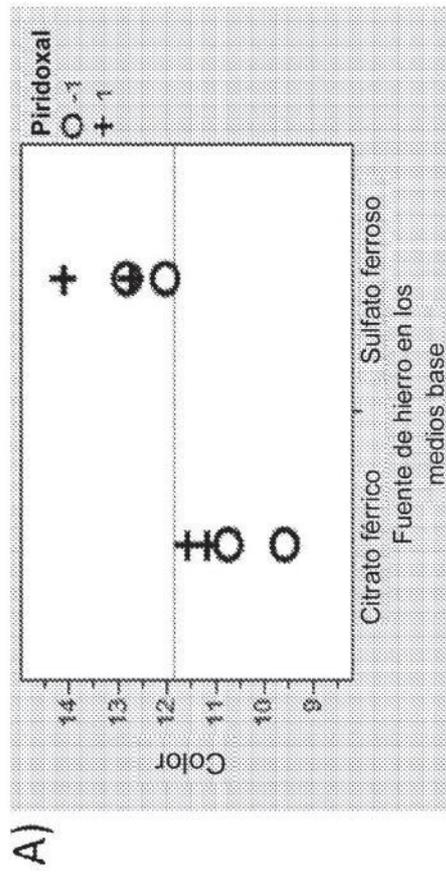


Figura 11

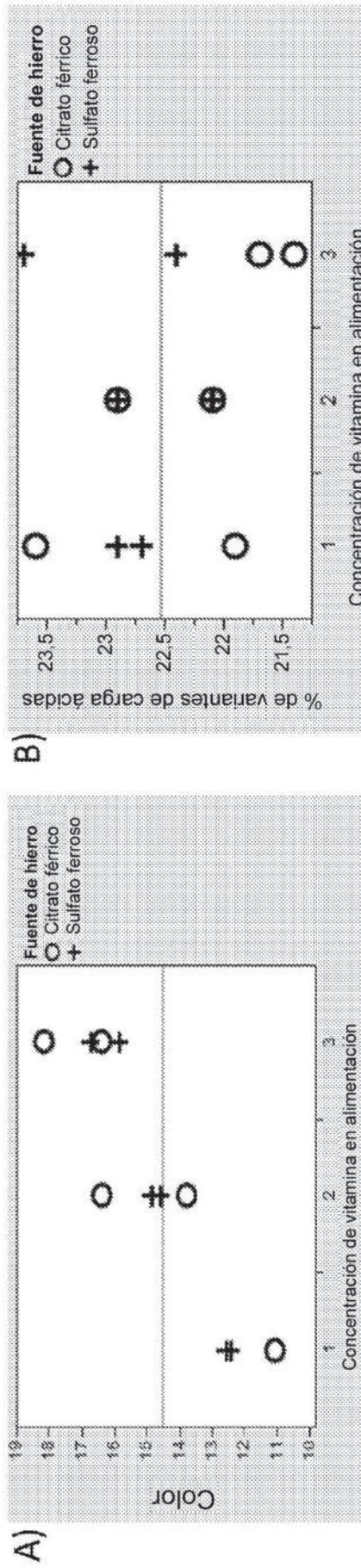


Figura 12

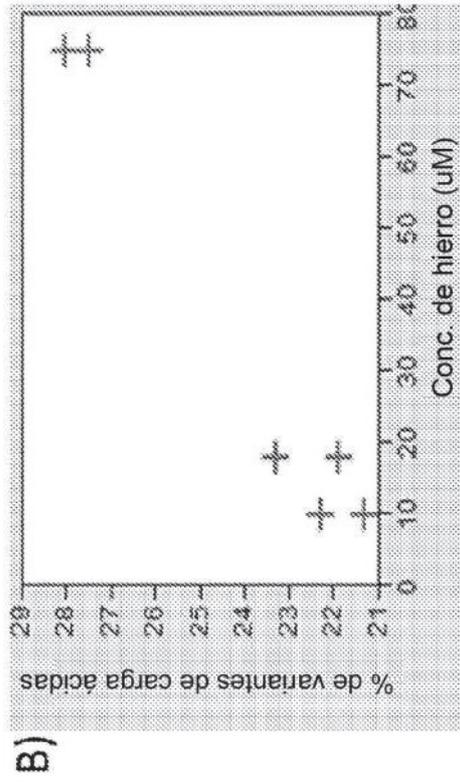
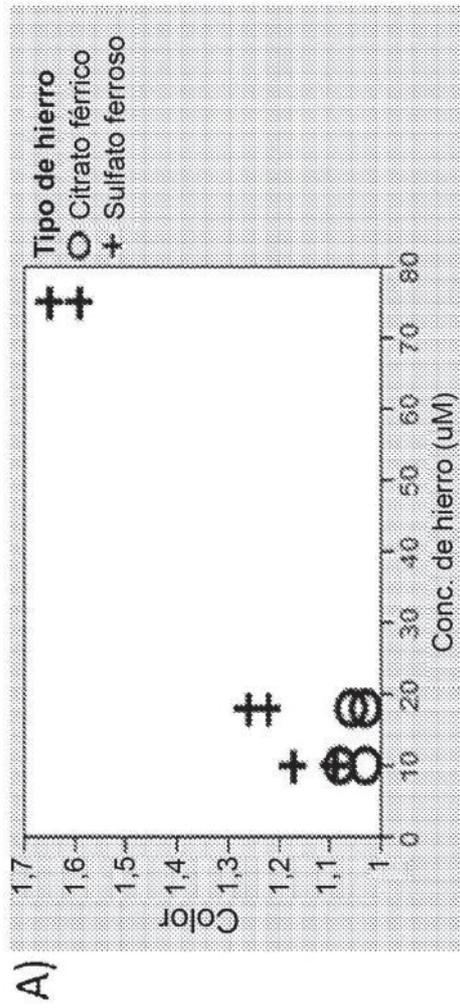
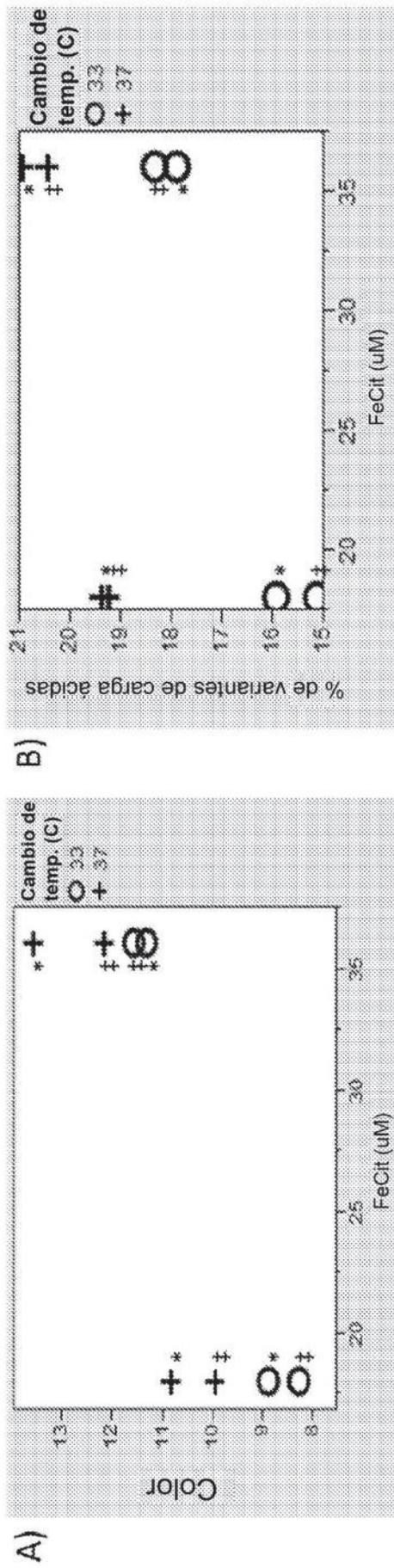
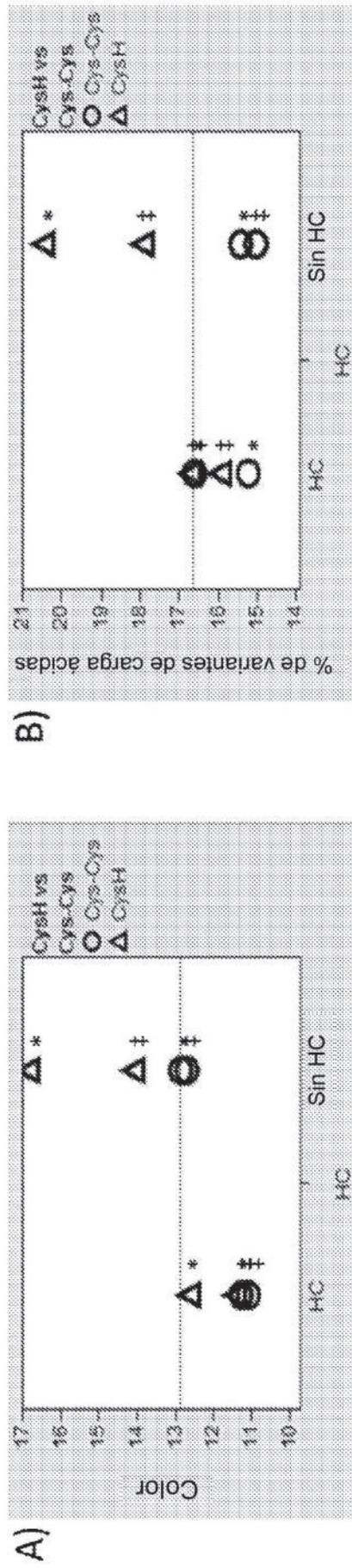


Figura 13



* Medios base 1 modificados
 † Medios base 3 modificados

Figura 14



* Concentración de vitamina al 100 % en los medios base

‡ Concentración de vitamina al 50 % en los medios base

