

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 307**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14721668 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2970875**

54 Título: **Composiciones de cultivo de células con antioxidantes y procedimientos para la producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799602 P

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

10.12.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VIJAYASANKARAN, NATARAJAN;
MEIER, STEVEN, J.;
VARMA, SHARAT y
YANG, YI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 798 307 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 cultivo de células con antioxidantes y procedimientos para la producción de polipéptidos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención, como se reivindica, se encuentra en el campo de la producción de anticuerpos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La tecnología de fabricación de cultivos de células se usa ampliamente para la producción de productos basados en proteínas, tales como formulaciones farmacéuticas o proteínas terapéuticas. La producción comercial de productos a base de proteínas, tales como un producto de anticuerpo, requiere la optimización de los parámetros del cultivo de células para que la célula produzca suficiente producto proteico para satisfacer las demandas de fabricación. Sin embargo, cuando los parámetros del cultivo de células se optimizan para mejorar la productividad del producto proteico, también es necesario mantener los atributos de calidad deseados del producto, tales como el perfil de glucosilación, los niveles de agregado, la heterogeneidad de carga y la integridad de la secuencia de aminoácidos (Li *et al.*, *mAbs*, 2010, 2(5): 466-477). Otro atributo de calidad de interés es el color del producto proteico. Deben cumplirse los requisitos reglamentarios con respecto a los niveles de color aceptables para formulaciones líquidas de productos terapéuticos para uso humano (*United States Pharmacopoeia Inc.*, 2000, p. 1926-1927 y *Council of Europe European Pharmacopoeia*, 2008, 7ª ed., p. 22). Por tanto, producir un producto proteico que tenga un color aceptable es un aspecto importante de la producción de proteínas terapéuticas.

25 Las tendencias recientes hacia la administración subcutánea de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos monoclonales, han ido acompañadas por un incremento en la concentración de la sustancia proteica formulada, por ejemplo a concentraciones de aproximadamente 100 mg/ml o más (Daugherty *et al.*, *Adv Drug Delivery Rev.*, 2006, 58(5-6):686-706). Se ha observado una correlación entre el incremento de la intensidad del color en composiciones que comprenden cantidades crecientes de proteína terapéutica y esta relación se puede deber a variantes de productos proteicos de bajo nivel previamente no observables por procedimientos estándar para controlar la intensidad de color del producto formulado.

35 La oxidación es una vía importante de degradación química para productos farmacéuticos proteicos. Por ejemplo, la metionina, la cisteína, la histidina, el triptófano y la tirosina son residuos de aminoácidos que son susceptibles a la oxidación debido a su reactividad con especies reactivas de oxígeno (ERO) y esta oxidación a menudo se observa en las formulaciones de proteínas farmacéuticas durante el almacenamiento. Aunque se sabe que las condiciones del cultivo de células pueden afectar a los atributos de calidad del producto proteico, tales como la producción de cantidades suficientes para la fabricación a gran escala, el impacto de estas condiciones sobre la intensidad del color del producto proteico final sigue sin estar claro.

40 El documento EP-A2 0591605 divulga un procedimiento de cultivo de células genéticamente modificadas para expresar seroalbúmina humana. Se añadió aminoguanidina al medio para suprimir la coloración de la seroalbúmina humana producida. Petters y Reed (*Theriogenology*, 1991, 35: 253) usaron hipotaurina o taurina en un medio de cultivo para mejorar el desarrollo de embriones de cerdo de una a dos células a blastocistos.

45 Existe una necesidad continua de proporcionar procedimientos mejorados y rentables de producción de proteínas (por ejemplo, anticuerpos) que tengan atributos de calidad de producto aceptables, tales como intensidad del color. Los medios de cultivo de células, ya sean químicamente indefinidos o químicamente definidos, que tienen componentes que administran de forma consecuyente productos proteicos a intensidades de color más bajas mientras mantienen una concentración de proteínas deseada (por ejemplo, ≥ 100 mg/ml), encontrarían uso en el desarrollo de productos proteicos, tales como anticuerpos.

50 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

55 La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

60 En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona un procedimiento de cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende hipotaurina o un análogo o precursor de la misma, en el que el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo del precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con la intensidad del color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en al menos aproximadamente un 0,1 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la

hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 500,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 40,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma es un medio de cultivo de células químicamente definido. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma es un medio de cultivo de células base. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma es un medio de cultivo de células de alimentación. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma durante la fase de crecimiento de la célula. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma durante la fase de producción de la célula. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se añade al medio de cultivo de células al menos un día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En cualquiera de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se puede añadir al medio de cultivo de células cualquier día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula es una célula de mamífero. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento del mismo.

En otros aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona procedimientos de cultivo de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en los que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende uno o más de los componentes (a)-(h): (a) hipotaurina; (b) S-carboximetilcisteína; (c) carnosina; (d) anserina; (e) hidroxianisol butilado; (f) ácido lipoico; (g) hidrato de quercitrina; y (h) aminoguanidina; y en el que el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende el uno o más de los componentes (a)-(h). En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en al menos aproximadamente un 0,1 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende el uno o más de los componentes (a)-(h). En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 75 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende el uno o más de los componentes (a)-(h). En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende el uno o más de los componentes (a)-(h). En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) comprende el uno o más componentes (a)-(h) en una cantidad seleccionada de: (a) hipotaurina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; (b) S-carboximetilcisteína a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; (c) carnosina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; (d) anserina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; (e) hidroxianisol butilado a una concentración de al menos aproximadamente

0,0001 mM; (f) ácido lipoico a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; (g) hidrato de quercitrina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; y (h) aminoguanidina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0003 mM. En otro modo de realización, el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende S-carboximetilcisteína a una concentración de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende carnosina a una concentración de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende anserina a una concentración de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende hidroxianisol butilado a una concentración de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,040 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende ácido lipoico a una concentración de aproximadamente 0,040 mM a aproximadamente 0,060 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende hidrato de quercitrina a una concentración de aproximadamente 0,010 mM a aproximadamente 0,020 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células comprende aminoguanidina a una concentración de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 245 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células comprende aminoguanidina a una concentración de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 10 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células de alimentación. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento de la célula. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de producción de la célula. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el uno o más de los componentes (a)-(h) se añaden al medio de cultivo de células al menos un día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el uno o más de los componentes (a)-(h) se añaden al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En cualquiera de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el uno o más de los componentes (a)-(h) se pueden añadir al medio de cultivo de células cualquier día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, en el que la célula es una célula de mamífero. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, en el que la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, en el que el polipéptido es un anticuerpo o fragmento del mismo.

En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento también proporciona procedimientos de producción de un polipéptido que comprenden la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un medio de cultivo de células que comprende hipotaurina o un análogo o precursor de la misma, y en el que el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en al menos aproximadamente un 0,1 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 500,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 40,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido. En algunos de los aspectos de la divulgación en

el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células de alimentación. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se añade al medio de cultivo de células al menos un día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En cualquiera de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se puede añadir al medio de cultivo de células cualquier día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, la célula es una célula de mamífero. En algunos aspectos de la divulgación, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el polipéptido es un anticuerpo. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende además la etapa de recuperar el polipéptido del medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, la composición que comprende el polipéptido recuperado es una composición líquida o una composición no líquida. En algunos aspectos de la divulgación, la composición que comprende el polipéptido recuperado aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado.

En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo en un medio de cultivo de células, en el que el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina; y en el que el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en al menos aproximadamente un 0,1 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por las células en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 75 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente indefinido. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células base. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células de alimentación. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de crecimiento de la célula. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células durante la fase de producción de la célula. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la hipotaurina se añade al medio de cultivo de células al menos un día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la hipotaurina se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, la hipotaurina se puede añadir al medio de cultivo de células cualquier día de un ciclo de cultivo de células. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la célula es una célula de mamífero. En algunos modos de realización, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el procedimiento comprende además la etapa de recuperar el anticuerpo o fragmento del mismo del medio de cultivo de células que comprende hipotaurina. En algunos modos de realización, una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo recuperado es una composición líquida o una composición no líquida. En algunos modos de realización, la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo recuperado aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado. En algunos de los modos de realización en el presente documento, se puede producir un anticuerpo o fragmento del mismo mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido

producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un kit para complementar un medio de cultivo de células con constituyentes definidos químicamente, comprendiendo el kit hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM, y en el que la hipotaurina o un análogo o precursor se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina.

10 En otros aspectos, la divulgación también proporciona un kit para complementar un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos, comprendiendo el kit uno o más de: (a) hipotaurina en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de hipotaurina en el medio de cultivo de células; (b) S-carboximetilcisteína en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de S-carboximetilcisteína en el medio de cultivo de células; (c) carnosina en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de carnosina en el medio de cultivo de células; (d) anserina en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de anserina en el medio de cultivo de células; (e) hidroxianisol butilado en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidroxianisol butilado; (f) ácido lipoico en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de ácido lipoico en el medio de cultivo de células; (g) hidrato de quercitrina en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidrato de quercitrina en el medio de cultivo de células; y (h) aminoguanidina en una cantidad para proporcionar al menos aproximadamente 0,0003 mM de aminoguanidina en el medio de cultivo de células.

25 En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona un medio de cultivo de células que comprende al menos aproximadamente 0,0001 mM de hipotaurina o un análogo o precursor de la misma seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina.

30 En otros aspectos de la divulgación, en el presente documento se proporciona un medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h): (a) al menos aproximadamente 0,0001 mM de hipotaurina; (b) al menos aproximadamente 0,0001 mM de S-carboximetilcisteína; (c) al menos aproximadamente 0,0001 mM de carnosina; (d) al menos aproximadamente 0,0001 mM de anserina; (e) al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidroxianisol butilado; (f) al menos aproximadamente 0,0001 mM de ácido lipoico; (g) al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidrato de quercitrina; y (h) al menos aproximadamente 0,0003 mM de aminoguanidina.

35 En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona una composición que comprende (a) una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido; y (b) cualquier medio de cultivo de células descrito en el presente documento.

40 En algunos aspectos de la divulgación, en el presente documento se proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) cualquier medio de cultivo de células descrito en el presente documento. En algunos modos de realización, el polipéptido se secreta en el medio de cultivo de células por una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La **figura 1** es un gráfico de compuestos representativos cribados para determinar el impacto sobre la intensidad de color en un medio de cultivo de células representativo que contiene un anticuerpo. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Los valores superiores al 0 % indican una intensidad de color incrementada. Los valores inferiores al 0% indican una intensidad de color reducida.

50 La **figura 2** es un subgráfico de la figura 1 que muestra compuestos que reducen la intensidad de color en un medio de cultivo de células representativo que contiene un anticuerpo. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Los valores inferiores al 0 % indican una intensidad de color reducida.

55 La **figura 3** es una serie de gráficos que muestran que un modelo de cultivo de células en matraz agitador es comparable al modelo de cultivo de células 2L a mayor escala correspondiente. **A)** Crecimiento celular en cultivo durante la duración de la incubación medido mediante la densidad de células viables (VCC) y expresado como número de células por volumen de cultivo de células. **B)** Viabilidad celular en cultivo de células durante la duración de la incubación medida por el número de células viables como porcentaje del número total de células. **C)** 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. SF indica el modelo de cultivo de células en matraz agitador. 2L indica un modelo de cultivo de células a mayor escala.

65 La **figura 4** es una serie de gráficos que muestran que la adición de hipotaurina al medio de cultivo de células no comprometió el crecimiento celular, la viabilidad celular o la producción de anticuerpos. **A)** Crecimiento celular en

5 cultivo durante la duración de la incubación medido mediante VCC y expresado como número de células por volumen de cultivo de células. **B)** Viabilidad celular en cultivo de células durante la duración de la incubación medida por el número de células viables como porcentaje del número total de células. **C)** 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.

10 La **figura 5** es un gráfico que muestra la intensidad de color de composiciones de anticuerpos aisladas de cultivos de células cultivadas en medios complementados con hipotaurina. Un 100 %, 50 % o 25 % indica medio base 1 complementado con hipotaurina 9,16 mM, 4,58 mM o 2,29 mM, respectivamente. Los círculos rellenos indican valores de intensidad de color para experimentos de cultivo de células. Los círculos vacíos indican valores de intensidad de color para experimentos de cribado de incubación. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Los valores inferiores al 0 % indican una intensidad de color reducida.

15 La **figura 6** es un gráfico que muestra la intensidad de color de composiciones de anticuerpos aisladas de cultivos de células cultivadas en medios complementados con hipotaurina. 3X, 2X o 1X indica medio base 3 complementado con hipotaurina 38,85 mM, 25,9 mM o 12,95 mM, respectivamente. Los círculos rellenos indican valores de intensidad de color para experimentos de cultivo de células. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Los valores inferiores al 0 % indican una intensidad de color reducida.

20 La **figura 7** contiene gráficos que muestran que la adición de hipotaurina o carboximetilcisteína a los medios no comprometió el crecimiento celular o la viabilidad celular. **A)** Crecimiento celular en cultivo durante la duración de la incubación medido mediante VCC y expresado como número de células por volumen de cultivo de células. **B)** Viabilidad celular en cultivo durante la duración de la incubación expresada como porcentaje del volumen total de cultivo.

25 La **figura 8** es un gráfico que muestra que la adición de hipotaurina o carboximetilcisteína a los medios no redujo significativamente la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos en cultivo de células durante la duración de la incubación se midió mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento y se expresó como valor de anticuerpos.

30 La **figura 9** es un gráfico que muestra la intensidad de color de composiciones de anticuerpos aisladas a partir de cultivos de células cultivadas en medios complementados con hipotaurina o carboximetilcisteína. **A y B)** indican dos ensayos de color diferentes usados para medir la intensidad de color. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Los valores inferiores al 0 % indican una intensidad de color reducida.

35 La **figura 10** es un gráfico que muestra la intensidad de color relativa de composiciones de anticuerpos aisladas de cultivos de células en medios complementados con taurina, carnosina, aminoguanidina, control negativo o control positivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 I. Definiciones

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.

50 Un "medio de cultivo de células químicamente definido" o "CDM" es un medio con una composición específica que está libre de productos derivados de un animal o una planta, tales como, por ejemplo, suero animal y 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 secreta 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.

55 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 un animal o una planta, tales como, por ejemplo, suero animal y peptona vegetal. Como se entendería por un experto en la técnica, un medio de cultivo de células químicamente indefinido puede contener un producto derivado de un animal o de una planta como fuente de nutrientes.

60 "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 el crecimiento y/o la proliferación 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 suministran nutrientes de cultivo adicionales, de forma continua o en incrementos separados, al cultivo durante el procedimiento de cultivo, con o sin recuperación periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo.

Un "cultivo por perfusión" es un cultivo mediante el cual las células se inmovilizan en el cultivo, por ejemplo, mediante filtración, encapsulación, anclaje a microtransportadores, etc., y el medio de cultivo se introduce y retira de forma continua o intermitente del recipiente de cultivo.

Un "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.

Como se usa en el presente documento, un "análogo de hipotaurina" se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a la hipotaurina, pero que difiere de la hipotaurina en la composición química (por ejemplo, difiere en el número, la ubicación o la naturaleza química de los grupos funcionales o sustituyentes en el núcleo de hipotaurina). El análogo de hipotaurina puede o no tener propiedades químicas o físicas diferentes que la hipotaurina y puede o no tener una actividad mejorada en los medios de cultivo de células en comparación con la hipotaurina, por ejemplo, reducir aún más la intensidad de color de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) producido en los medios de cultivo de células en comparación con la hipotaurina. Por ejemplo, el análogo de hipotaurina puede ser más hidrófilo o puede tener una reactividad alterada en comparación con la hipotaurina. El análogo de hipotaurina puede imitar la actividad química y/o biológica de la hipotaurina (es decir, puede tener una actividad similar o idéntica) o, en algunos casos, puede tener actividad incrementada o disminuida en comparación con la hipotaurina.

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.

Un "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.

Un "ácido nucleico aislado" significa y engloba una secuencia no natural, recombinante o una natural fuera de o separada de su contexto habitual. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que de manera ordinaria expresan la proteína donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Una proteína "aislada" (por ejemplo, un anticuerpo aislado) es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína no estará presente. Normalmente, sin embargo, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

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.

"Contaminantes" se refiere a materiales que son diferentes del producto de polipéptidos deseado. 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.

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 de 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 dentro de 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; factor de liberación 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, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes, tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensorio pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa o activador del plasminógeno de la orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (quimiocina de regulación por activación, expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora mulleriana; 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 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-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como FGF-alfa y FGF-beta; 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 insulínico I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBP); proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, 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 superficie de membrana; factor de aceleración de la degradación; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de referencia; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-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.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con afinidad madurada.

La expresión "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 comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se pueden sintetizar sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares en animales que tienen parte o la totalidad de los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*,

Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)).

5 El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal 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.

10 Los vehículos, excipientes o estabilizadores "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas (Remington's Pharmaceutical Sciences (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; 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, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween™, polietilenglicol (PEG) y Pluronic™.

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

25 Un líquido "incoloreo 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.

30 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichos compuestos, y similares.

35 Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

40 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que están dirigidos 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.

45 Donde los aspectos o modos de realización de la invención se describen en términos de un grupo de Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención 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 invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

II. Medios de cultivo de células

50 Los medios de cultivo de células proporcionados en el presente documento pueden encontrar uso en procedimientos (por ejemplo, de cultivo de células y producción de polipéptidos) y en composiciones (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas) como se detalla en el presente documento. Los componentes en los medios se han identificado como que pueden proporcionar un producto de polipéptidos (por ejemplo, una proteína terapéutica) con atributos de calidad aceptables, tales como una intensidad de color aceptable. Uno o más de estos componentes en los medios identificados se pueden usar para proporcionar un producto de polipéptidos con una intensidad de color aceptable.

55 Como se usa en el presente documento, "una intensidad de color aceptable" de un producto de polipéptidos (por ejemplo, composición que comprende el polipéptido) se puede referir a la intensidad de color requerida para la aprobación reguladora del producto de polipéptidos o la intensidad de color deseada para su uso en la evaluación de la consistencia entre lotes de lotes del producto de polipéptidos. En algunos aspectos de la divulgación, el uno o más componentes en los medios es un antioxidante. En algunos aspectos de la divulgación, el uno o más componentes en los medios se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, anserina, hidroxianisol butilado, carnosina, ácido lipoico, hidrato de quercitrina y aminoguanidina. De acuerdo con la invención, el uno o más componentes en los medios es hipotaurina. En algunos aspectos de la divulgación, se selecciona un análogo o precursor de la hipotaurina del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos aspectos de la divulgación, el uno o más componentes en los medios es taurina, ácido lipoico reducido o carvedilol.

Se pueden añadir componentes en los medios a los medios de cultivo de células en formas que se conozcan en la técnica. Por ejemplo, la hipotaurina se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 300-84-5, la S-carboximetilcisteína se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 638-23-3, la anserina se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 10030-52-1, el hidroxianisol butilado se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 25013-16-5, la carnosina se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 305-84-0, el ácido lipoico se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 1200-22-2, el hidrato de quercitrina se puede proporcionar como un compuesto identificado por el número CAS 522-12-3. Como otro ejemplo, se pueden proporcionar análogos o precursores de hipotaurina tales como S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y/o taurina. En algunos aspectos de la divulgación, la S-carboximetilcisteína se proporciona como un compuesto identificado por el número CAS 638-23-3, la cisteamina se proporciona como un compuesto identificado por el número CAS 60-23-1, el ácido cisteinsulfínico se proporciona como un compuesto identificado por el número CAS 1115-65-7, y la taurina se proporciona como un compuesto identificado por el número CAS 107-35-7. En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un compuesto enumerado en la tabla 4, tal como ácido lipoico reducido identificado por el número CAS 462-20-4 o carvedilol identificado por el número CAS 72956-09-3. En algunos modos de realización, la aminoguanidina se proporciona como clorhidrato de aminoguanidina identificado por el número CAS 1937-19-5. Los componentes en los medios proporcionados en el presente documento se pueden proporcionar al medio de cultivo de células como una sal, un hidrato o un hidrato de sal o cualquier otra forma conocida por un experto en la técnica. Los componentes en los medios también se pueden proporcionar a los medios de cultivo de células como una solución, un extracto o en forma sólida. En algunos modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio químicamente definido. En otros modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células es un medio químicamente indefinido.

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: (a) hipotaurina; (b) S-carboximetilcisteína; (c) carnosina; (d) anserina; (e) hidroxianisol butilado; (f) ácido lipoico; (g) hidrato de quercitrina; y (h) aminoguanidina. En algunos modos de realización, el 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), (g) y (h). 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) y (h), 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), (g) y (h) puede comprender cualquier combinación de los componentes siempre que estén presentes al menos cuatro de los componentes.

En algunos aspectos de la divulgación, 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) hipotaurina; (b) S-carboximetilcisteína; (c) carnosina; (d) anserina; (e) hidroxianisol butilado; (f) ácido lipoico; (g) hidrato de quercitrina; y (h) aminoguanidina en 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)-(h), tal como un medio que comprende los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) o un medio que comprende los componentes (a), (b) y (g) o un medio que comprende solo uno de los componentes (a)-(h)) 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 un aspecto, el medio de cultivo de células es un medio químicamente definido. En otro aspecto, el medio de cultivo de células es un medio químicamente indefinido. En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo de células comprende uno o más de los componentes (a)-(h), en el que (a) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de hipotaurina, (b) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de S-carboximetilcisteína, (c) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de carnosina, (d) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de anserina, (e) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidroxianisol butilado, (f) es al menos aproximadamente 0,0001 mM ácido lipoico, (g) es al menos aproximadamente 0,0001 mM de hidrato de quercitrina, y (h) es al menos aproximadamente 0,0003 mM de aminoguanidina. En algunos modos de realización, un medio de cultivo de células comprende uno o más de los componentes (a)-(h), en el que (a) es de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM de hipotaurina, (b) es de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM de S-carboximetilcisteína, (c) es de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM de carnosina, (d) es de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM de anserina, (e) es de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,040 mM de hidroxianisol butilado, (f) es de aproximadamente 0,040 mM a aproximadamente 0,060 mM de ácido lipoico, (g) es de aproximadamente 0,010 mM a aproximadamente 0,020 mM de hidrato de quercitrina, y (h) es de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 10 mM de aminoguanidina.

Tabla 1. Cantidades ejemplares de componentes en los medios

Componente	Cantidad de componente en el medio
(a) Hipotaurina	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 920 mM; de

Componente	Cantidad de componente en el medio
	<p>aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 820 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 720 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 620 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 520 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 420 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 320 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 220 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 10,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 20,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 40,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 80,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 160,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 320 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 640 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 700 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 1,5 mM a 100 mM; de aproximadamente 1,6 mM a aproximadamente 90 mM; de aproximadamente 1,7 mM a aproximadamente 80 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 70 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 60 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 9,0 o 12 o 25 o 38 o 45 o 50 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 9,0 o 12 mM y no más de aproximadamente 60 o 55 o 50 o 45 o 40 mM.</p>
(b) S-carboximetilcisteína	<p>de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 80 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 60 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 40 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 75 mM; de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 25 mM; de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM; de aproximadamente 7,0 mM a aproximadamente 13 mM; de 8,0 mM a aproximadamente 12 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 10 o 15 o 20 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 8,0 o 10 o 12 mM y no más de aproximadamente 25 o 20 o 15 mM.</p>
(c) Carnosina	<p>de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 5,0 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 18 mM; de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 16 mM; de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM; de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o</p>

ES 2 798 307 T3

Componente	Cantidad de componente en el medio
	6,0 o 7,0 o 8,0 o 9,0 o 10 o 11 o 12 o 13 o 14 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 6,0 o 7,0 o 8,0 o 9,0 o 10 o 11 y no más de 15 o 14 o 13 mM.
(d) Anserina	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 5,0 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM; de aproximadamente 3,2 mM a aproximadamente 5,0 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 6,0 o 7,0 o 8,0 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 mM y no más de 9,0 o 8,0 o 7,0 o 6,0 mM.
(e) Hidroxianisol butilado	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,15 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,1 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,05 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,15 mM a aproximadamente 0,2 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,15 mM; de aproximadamente 0,015 mM a aproximadamente 0,1 mM; de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 0,05 mM; de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 0,04 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,015 o 0,02 o 0,025 o 0,03 o 0,035 o 0,04 o 0,045 o 0,05 o 0,055 o 0,06 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,015 o 0,02 o 0,025 o 0,03 o 0,035 o 0,04 mM y no más de 0,06 o 0,055 o 0,05 mM.
(f) Ácido lipoico	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1,25 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1,0 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,75 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,5 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,25 mM; de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 1,5 mM; de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 1,25 mM; de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 1,0 mM; de aproximadamente 0,032 mM a aproximadamente 0,1 mM; de aproximadamente 0,034 mM a aproximadamente 0,09 mM; de aproximadamente 0,036 mM a aproximadamente 0,08 mM; de aproximadamente 0,038 mM a aproximadamente 0,07 mM; de aproximadamente 0,04 mM a aproximadamente 0,06 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,02 o 0,03 o 0,04 o 0,05 mM y no más de 0,09 o 0,08 o 0,07 mM.
(g) Hidrato de quercitrina	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,035 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,03 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,025 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,02 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,015 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 0,01 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,015 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente

Componente	Cantidad de componente en el medio
	0,04 mM; de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,035 mM a aproximadamente 0,04 mM; de aproximadamente 0,0075 mM a aproximadamente 0,035 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,03 mM; de aproximadamente 0,015 mM a aproximadamente 0,025 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,02 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,011 o 0,012 o 0,013 o 0,014 o 0,015 o 0,016 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,011 o 0,012 o 0,013 o 0,014 mM y no más de 0,02 o 0,019 o 0,018 mM.
(h) Aminoguanidina	de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 245 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 200 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 150 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 125 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 75 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 40 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 30 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 25 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 7,5 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 2,5 mM; de aproximadamente 0,0003 a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0003, 0,003, 0,03, 0,3, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 y 10 mM.

En algunos aspectos, la divulgación en el presente documento proporciona un medio de cultivo de células que comprende hipotaurina o un análogo o precursor de la misma seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células comprende uno o más de los siguientes componentes: (a) hipotaurina; (b) S-carboximetilcisteína; (c) cisteamina; (d) ácido cisteinsulfínico; y (e) taurina. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células comprende 2 o 3 o 4 o cada uno de los componentes (a), (b), (c), (d) y (e). 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) y (e), 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 tres de los componentes (a), (b), (c), (d) y (e) puede comprender cualquier combinación de los componentes siempre que estén presentes al menos tres de los componentes. Los análogos de hipotaurina incluyen, por ejemplo, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. Los expertos en la técnica conocen bien los ejemplos de precursores de hipotaurina y, en algunos aspectos, un precursor de hipotaurina puede ser un análogo de hipotaurina.

En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento contiene hipotaurina o un análogo o precursor de la misma en cantidades como se describe en la tabla 2. Se entiende que un medio puede comprender uno cualquiera o más de los componentes en el medio de la tabla 2 (por ejemplo, uno cualquiera o más de los componentes (a)-(e), tal como un medio que comprende los componentes (a), (b), (c) y (d) o un medio que comprende los componentes (a), (b) y (c) o un medio que comprende solo uno de los componentes (a)-(e)) en cualquiera de las cantidades enumeradas en la tabla 2, igual que si todas y cada una de las combinaciones de componentes y cantidades se enumerara específica e individualmente. En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo de células comprende hipotaurina o un análogo o precursor de la misma, tal como hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y/o taurina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM. En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo de células comprende hipotaurina o un análogo o precursor de la misma, tal como hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y/o taurina a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 500,0 mM.

Tabla 2. Cantidades ejemplares de componentes en los medios

Componente	Cantidad de componente en el medio
(a) Hipotaurina	de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 820 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente

	<p>720 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 620 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 520 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 420 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 320 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 220 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 10,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 20,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 40,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 80,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 160,0 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 320 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 640 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 920 mM; de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 700 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 1,5 mM a 100 mM; de aproximadamente 1,6 mM a aproximadamente 90 mM; de aproximadamente 1,7 mM a aproximadamente 80 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 70 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 60 mM; de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 50 mM; de aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 9,0 o 12 o 25 o 38 o 45 o 50 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 9,0 o 12 mM y no más de aproximadamente 60 o 55 o 50 o 45 o 40 mM.</p>
(b) S-carboximetilcisteína	<p>de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 80 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 60 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 40 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 120 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 75 mM; de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 25 mM; de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 15 mM; de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM; de aproximadamente 7,0 mM a aproximadamente 13 mM; de 8,0 mM a aproximadamente 12 mM; de aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 10 o 15 o 20 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1,0 o 2,0 o 3,0 o 4,0 o 5,0 o 8,0 o 10 o 12 mM y no más de aproximadamente 25 o 20 o 15 mM.</p>
(c) cisteamina	<p>de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 250 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 200 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 150 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 200 mM; de aproximadamente 0,04 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 0,04 mM a aproximadamente 0,8 mM; de aproximadamente 0,06 mM a aproximadamente 0,6 mM; de aproximadamente</p>

	0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,2 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,02 o 0,05 o 0,1 o 0,25 o 0,5 o 1 o 5 o 10 o 25 o 50 o 100 o 200 o 300 mM; al menos aproximadamente 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,02 o 0,05 o 0,1 o 0,25 mM y no más de aproximadamente 50 o 40 o 30 mM.
(d) ácido cisteinsulfínico	de aproximadamente 0,0001 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,001 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,01 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,1 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 80 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 60 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 40 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 20 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 1 to 100 mM; de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM; de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM; de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM; de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 0,6 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 0,2 o 0,3 o 0,4 o 0,5 o 0,6 o 0,7 o 1 o 10 o 25 o 50 o 100 mM; al menos aproximadamente 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 0,1 o 0,2 o 0,3 o 0,4 mM y no más de 20 o 10 o 15 mM.
(e) taurina	de aproximadamente 0,0001 mM a 500 mM; de aproximadamente 0,001 mM a 500 mM; de aproximadamente 0,01 mM a 500 mM; de aproximadamente 0,1 mM a 500 mM; de aproximadamente 0,5 mM a 500 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 450 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 400 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 350 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 250 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 200 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 150 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a 100 mM; de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 350 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 450 mM a aproximadamente 500 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 400 mM; de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 200 mM; de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 100 mM; de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10 mM; aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 o 8 o 9 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 0,0001 o 0,001 o 0,01 o 0,1 o 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 y no más de 13 o 12 o 11 mM.

En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento comprende ácido lipoico reducido a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 0,5 mM. En algunos aspectos, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento comprende carvedilol a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 1,5 mM.

5

Los componentes en los medios individuales proporcionados en el presente documento pueden estar presentes en cantidades que dan como resultado una o más propiedades ventajosas para cultivar células y/o la producción de polipéptidos a partir del cultivo de células. Las propiedades ventajosas incluyen, pero no se limitan a, oxidación reducida de polipéptidos en cultivo de células y/o intensidad de color reducida de una composición que comprende un polipéptido producido por una célula cultivada en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento. Las propiedades ventajosas de los medios de cultivo de células proporcionados en el presente documento también incluyen la reducción de la intensidad de color de una composición que comprende un polipéptido producido por una célula cultivada en los medios de cultivo de células sin afectar a uno o más atributos del producto, tales como la cantidad del polipéptido producido por las células (por ejemplo, valor de anticuerpos), el perfil de glucosilación (por ejemplo, N-glucosilación) del polipéptido, la heterogeneidad de carga del polipéptido en la composición o la integridad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Una o más propiedades ventajosas para cultivar una célula en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento es la intensidad de color reducida de una composición que comprende un polipéptido producido por la célula sin afectar a la viabilidad celular, la cantidad del polipéptido producido por las células, el perfil de glucosilación (por ejemplo, N-glucosilación) del polipéptido, la heterogeneidad de carga de polipéptido en la composición y/o la integridad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Otra o más propiedades ventajosas para cultivar una célula en un medio de cultivo de

10

15

20

células proporcionado en el presente documento es la intensidad de color reducida de una composición que comprende un polipéptido producido por la célula y la oxidación reducida del polipéptido en el cultivo de células. Estas propiedades ventajosas son aplicables a procedimientos de cultivo de una célula que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés y a procedimientos de producción de un polipéptido de interés en el cultivo de células como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos de la divulgación, en el presente documento se proporciona un componente en los medios más seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, anserina, hidroxianisol butilado, carnosina, ácido lipoico, hidrato de quercitrina y aminoguanidina en una cantidad que da como resultado una o más propiedades ventajosas para cultivar células y/o la producción de polipéptidos a partir del cultivo de células. En algunos modos de realización, una cantidad de hipotaurina en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1,6 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 1,7 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 1,9 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50 mM o de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de S-carboximetilcisteína en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM, de aproximadamente 7,0 mM a aproximadamente 13 mM o de 8,0 mM a aproximadamente 12 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de anserina en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de hidroxianisol butilado en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 0,2 mM, de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 0,05 mM o de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,04 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de carnosina en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM o de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de ácido lipoico en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1,5 mM de ácido lipoico, de aproximadamente 0,036 mM a aproximadamente 0,08 mM, de aproximadamente 0,038 mM a aproximadamente 0,07 mM o de aproximadamente 0,04 mM a aproximadamente 0,06 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de hidrato de quercitrina en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 0,04 mM, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,03 mM, de aproximadamente 0,015 mM a aproximadamente 0,025 mM o de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,02 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de aminoguanidina en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 245 mM, de aproximadamente 0,003 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 10 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de un componente de medio más seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, anserina, hidroxianisol butilado, carnosina, ácido lipoico, hidrato de quercitrina y aminoguanidina en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas se proporciona en la tabla 1.

En algunos aspectos de la divulgación, en el presente documento se proporciona un componente en los medios más seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina en una cantidad que da como resultado una o más propiedades ventajosas para cultivar células y/o la producción de polipéptidos a partir del cultivo de células. En algunos modos de realización, una cantidad de hipotaurina en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1,6 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 1,7 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 1,8 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 1,9 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50 mM o de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de S-carboximetilcisteína en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 6,0 mM a aproximadamente 14 mM, de aproximadamente 7,0 mM a aproximadamente 13 mM o de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de cisteamina en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 0,04 mM a aproximadamente 0,8 mM, de aproximadamente 0,06 mM a aproximadamente 0,6 mM, de aproximadamente 0,08 mM a aproximadamente 0,4 mM o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de ácido cisteinsulfínico en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,1 mM a 100 mM, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 0,2 mM a

aproximadamente 0,8 mM o de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 0,6 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de taurina en los medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas es de aproximadamente 0,5 mM a 500 mM, de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10 mM. En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad de un componente de medio más seleccionado del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina en medios de cultivo de células que da como resultado una o más propiedades ventajosas se proporciona en la tabla 2.

Un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento, en un aspecto, da como resultado uno o más atributos de calidad del producto favorables o propiedad ventajosa, cuando se usa en un procedimiento de producción de un polipéptido en cultivo de células en comparación con los atributos de calidad del polipéptido cuando se produce en un medio diferente. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) formadas a través del uso de determinados componentes en los medios pueden oxidar aminoácidos específicos del polipéptido y producir productos de polipéptidos oxidados. La presencia de dichas especies de proteínas oxidadas también puede alterar los atributos de calidad del producto de un producto proteico, tales como la intensidad de color, lo que puede ser particularmente significativo para los productos de polipéptidos que se formulan a cualquier concentración tal como, pero sin limitarse a, una concentración de mayor que cualquiera de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml o aproximadamente 75 mg/ml hasta 100 mg/ml. La presencia de especies de proteínas oxidadas puede alterar los atributos de calidad del producto de un producto proteico, tales como la intensidad de color, lo que puede ser particularmente significativo para los productos de polipéptidos que se formulan a concentraciones mayores que cualquiera de aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml. La intensidad de color de una composición que comprende un polipéptido producido con un medio detallado en el presente documento (que incluye una composición que comprende al menos aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, 200 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml del polipéptido, tal como un anticuerpo) se puede evaluar usando un ensayo de color tal como uno descrito en el presente documento o en, pero sin limitarse a, el patrón de color de la Farmacopea de los Estados Unidos y el 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, 7ª ed. P.22. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, un medio de cultivo de células como se define en las reivindicaciones se puede usar para la preparación de composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo que tienen una intensidad de color reducida en comparación con una solución de referencia medida por un ensayo de color. Por ejemplo, la intensidad de color de una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) que comprende un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido terapéutico) producido usando un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento se puede reducir en cualquier cantidad que incluya, pero sin limitarse a, al menos aproximadamente un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % o más en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido usando un medio de cultivo de células que no comprende uno o más de los componentes de la tabla 1 o la tabla 2.

Medios disponibles comercialmente tales como, pero sin limitarse a, F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Sigma), caldo Luria (LB) y caldo Terrific (TB), que son adecuados para cultivar células se pueden complementar con cualquiera de los componentes en los medios como se detalla en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit como se proporciona). Además, se puede complementar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes y Sato, *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), Vijayasankaran *et al.*, *Biomacromolecules.*, 6:605:611 (2005), Patkar *et al.*, *J Biotechnology*, 93:217-229 (2002), las patentes de EE. UU. n.º 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 patente de EE. UU. n.º 30.985; o la patente de EE. UU. n.º 5.122.469 con cualquiera de los componentes en los medios como se detalla en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit como se proporciona).

En algunos modos de realización, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento comprende cistina y está libre de cisteína. En algunos modos de realización, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento comprende citrato férrico y está libre de sulfato ferroso. En algunos modos de realización en el presente documento, un medio de cultivo de células proporcionado está libre de cisteína y sulfato ferroso. En algunos modos de realización, el medio está libre de cisteína y sulfato ferroso y comprende cistina y/o citrato férrico. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, los medios de cultivo de células pueden ser un medio base o un medio de alimentación. Se pueden usar 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 patente de EE. UU. n.º 6.180.401.

Cualquier medio proporcionado en el presente documento también se puede complementar 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. En algunos aspectos, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento contiene proteínas derivadas de una planta o un animal. En algunos modos de realización, un cultivo de células proporcionado en el presente documento está libre de proteínas derivadas de una planta o un animal. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica.

III. Procedimientos y usos

En el presente documento se proporcionan procedimientos para cultivar células en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento para la producción de polipéptidos de interés. En algunos aspectos de la divulgación se proporciona un procedimiento para cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende uno o más de componentes seleccionados del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, carnosina, anserina, hidroxianisol butilado, ácido lipoico e hidrato de quercitrina. En algunos aspectos de la divulgación se proporciona un procedimiento para cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende uno o más de componentes seleccionados del grupo que consiste en (a) hipotaurina, (b) S-carboximetilcisteína, (c) carnosina, (d) anserina, (e) hidroxianisol butilado, (f) ácido lipoico; (g) hidrato de quercitrina; y (h) aminoguanidina, y en el que el medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(h) reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende uno o más de los componentes (a)-(h). En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en al menos aproximadamente un 0,1 %. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en al menos aproximadamente un 5 %. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 75 %. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende uno o más componentes en una cantidad seleccionada de (a) hipotaurina a una concentración de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM, (b) S-carboximetilcisteína a una concentración de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM, (c) carnosina a una concentración de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM, (d) anserina a una concentración de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM, (e) hidroxianisol butilado a una concentración de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,040 mM, (f) ácido lipoico a una concentración de aproximadamente 0,040 mM a aproximadamente 0,060 mM, (g) hidrato de quercitrina a una concentración de aproximadamente 0,010 mM a aproximadamente 0,020 mM y (h) aminoguanidina a una concentración de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 20 mM. En algunos de los aspectos de la divulgación en el presente documento, el uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en (a) hipotaurina, (b) S-carboximetilcisteína, (c) carnosina, (d) anserina, (e) hidroxianisol butilado, (f) ácido lipoico; (g) hidrato de quercitrina; y (h) aminoguanidina se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días.

En algunos otros aspectos se proporciona un procedimiento para cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación se proporciona un procedimiento para cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma, y en el que el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en al menos aproximadamente un 0,1 %. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en al menos aproximadamente un 5 %. En algunos aspectos de la divulgación, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM. En algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 500 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 40 mM. En algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos de los aspectos de la

divulgación en el presente documento, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En algunos aspectos de la divulgación, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma no se añade al medio de cultivo de células de forma incremental en el transcurso de un ciclo de cultivo de células.

5 También se proporcionan en el presente documento procedimientos de producción de un anticuerpo o fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones, que comprenden la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo en un medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina. Los procedimientos de producción de un anticuerpo o fragmento
10 del mismo como se define en las reivindicaciones comprenden la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina, y en el que el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula en comparación con una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina. En algunos modos de realización, la
15 intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en al menos aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en al menos aproximadamente un 5 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 75 %. En algunos de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM. En algunos de los modos de realización en el presente documento se añade hipotaurina al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan en el presente documento procedimientos de producción de un anticuerpo o un fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones, que comprenden la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un medio de cultivo de células, en el que
30 el medio de cultivo de células comprende hipotaurina, y en el que el medio de cultivo de células que comprende la hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula en comparación con la intensidad de color de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula cultivada en medio de cultivo de células que no comprende la hipotaurina. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en al menos aproximadamente un 0,1 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo se reduce en al menos aproximadamente un 5 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color de la composición que comprende el polipéptido se reduce en de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 %. En algunos modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina a una concentración de al menos
40 aproximadamente 0,0001 mM. En algunos modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 500 mM. En algunos modos de realización, el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 40 mM. En algunos de los modos de realización en el presente documento, la hipotaurina se añade al medio de cultivo de células el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días. En algunos modos de realización, la hipotaurina no se añade al medio de cultivo de células de forma incremental en el transcurso de un ciclo de cultivo de células.

En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, el medio de cultivo de células usado en los procedimientos descritos en el presente documento puede ser un medio de cultivo de células químicamente definido de un medio de cultivo de células químicamente indefinido. El medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se puede usar como un medio de cultivo de células base o como un medio de células de alimentación. En algunos modos de realización, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se usa en un procedimiento para cultivar la célula durante la fase de crecimiento de la célula. En algunos modos de realización, un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se usa en un procedimiento para cultivar la célula durante la fase de producción de la célula. En cualquiera de los procedimientos en el presente documento, la célula puede ser una célula de mamífero tal como una célula CHO. El polipéptido de interés es un anticuerpo o fragmento del mismo.

En otros modos de realización en el presente documento se recupera el polipéptido de interés. Una composición que comprende el polipéptido recuperado se puede someter a al menos una etapa de purificación antes de la evaluación de la intensidad de color usando un ensayo de color cuantitativo o cualitativo como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, la composición que comprende el polipéptido recuperado es una composición líquida o una composición no líquida. En algunos modos de realización, la composición líquida o la composición no líquida que comprende un polipéptido recuperado se puede evaluar para determinar la intensidad de color usando un ensayo de color como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica. Por ejemplo, una composición no líquida que comprende el polipéptido recuperado puede ser una composición liofilizada

que se reconstituye posteriormente antes de la medición de la intensidad de color. En algunos modos de realización en el presente documento, la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se reduce en al menos un 0,1 % en comparación con la intensidad de color de una composición que comprende el polipéptido producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina. En algunos modos de realización, la intensidad de color se reduce en al menos aproximadamente un 0,1 %, en al menos aproximadamente un 0,2 %, en al menos aproximadamente un 0,3 %, en al menos aproximadamente un 0,4 %, en al menos aproximadamente un 0,5 %, en al menos aproximadamente un 0,6 %, en al menos aproximadamente un 0,7 %, en al menos aproximadamente un 0,8 %, en al menos aproximadamente un 0,8 % o en de al menos aproximadamente un 0,9 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color se reduce en al menos aproximadamente un 1 %, en al menos aproximadamente un 2 %, en al menos aproximadamente un 3 %, en al menos aproximadamente un 4 %, en al menos aproximadamente un 5 %, en al menos aproximadamente un 10 %, en al menos aproximadamente un 15 %, en al menos aproximadamente un 20 %, en al menos aproximadamente un 25 %, en al menos aproximadamente un 30 %, en al menos aproximadamente un 35 %, en al menos aproximadamente un 40 %, en al menos aproximadamente un 45 %, en al menos aproximadamente un 50 %, en al menos aproximadamente un 60 %, en al menos aproximadamente un 70 %, en al menos aproximadamente un 80 %, o en de al menos aproximadamente 90 % a aproximadamente un 100 %. En algunos modos de realización, la intensidad de color se reduce en aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 % a aproximadamente un 1,0 %. En algunos modos de realización, la intensidad del color se reduce en aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 16 %, aproximadamente un 17 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 19 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 21 %, aproximadamente un 22 %, aproximadamente un 23 %, aproximadamente un 24 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 26 %, aproximadamente un 27 %, aproximadamente un 28 %, aproximadamente un 29 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 31 %, aproximadamente un 32 %, aproximadamente un 33 %, aproximadamente un 34 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 %. En algunos modos de realización, la intensidad del color se reduce en de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 25 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 35 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 45 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 25 %. En algunos modos de realización, una composición que comprende un polipéptido recuperado aparece como un líquido o composición incoloro o ligeramente coloreado. Se puede determinar que un líquido o composición es incoloro o ligeramente coloreado usando un ensayo de color como se describe en el presente documento o un ensayo de color conocido por un experto en la técnica. En otro modo de realización, la composición es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable como se describe en el presente documento.

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 aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 125 mg/ml o al menos aproximadamente 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 clara. Las formulaciones que comprenden un polipéptido de interés pueden ser adecuadas para su inyección, tal como inyección subcutánea en un individuo (por ejemplo, inyección subcutánea en un ser humano). En algunos aspectos de la divulgación, una formulación que comprende un polipéptido de interés 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 clara.

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

65 *Producción de polipéptidos*

Los medios de cultivo de células 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 cualquier polipéptido incluyendo cualquier aspecto o modo de realización del polipéptido como se describe en el presente documento. Los polipéptidos producidos por las composiciones (por ejemplo, una célula cultivada en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento) y procedimientos detallados en el presente documento y presentes en las composiciones (por ejemplo, medios de cultivo de células que comprenden el polipéptido producido) 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. El polipéptido es secretado directamente al medio por la célula huésped.

Se puede producir cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que se pueda expresar 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 anticuerpos o fragmentos de los mismos que se pueden expresar de forma deseable de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán sobre la base de una actividad biológica o química de interés. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear para expresar cualquier anticuerpo farmacéutica o comercialmente pertinente.

Los procedimientos para producir polipéptidos, tales como anticuerpos, en cultivo de células son bien conocidos en la técnica. En el presente documento se proporcionan procedimientos ejemplares no limitantes para producir un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos) en cultivo de células. Un experto en la técnica puede adaptar los procedimientos del presente documento para la producción de otras proteínas, tales como inhibidores basados en proteínas. Véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Current Protocols in Protein Science*, (Horswill *et al.*, 2006); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6ª ed., J. Wiley and Sons, 2010) para técnicas y procedimientos en general bien conocidos y comúnmente empleados para la producción de proteínas (por ejemplo, proteínas terapéuticas).

(A) Preparación de anticuerpos

El anticuerpo producido en cultivo de células usando un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento está dirigido contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración de composiciones que comprenden el anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero.

(i) Preparación de antígenos

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Dichas células se pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) Determinados procedimientos basados en anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de interés se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), y descrito adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) con respecto a los hibridomas humanos-humanos. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales humanos IgM naturales a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical*

Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Para otras técnicas de hibridoma diversas, véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos totalmente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de EE. UU. n.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe como sigue. En un modo de realización, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para producir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de un polipéptido de interés o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como el monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.). El suero de los animales inmunizados se analiza para determinar la presencia de anticuerpos anti-antígeno, y se administran inmunizaciones de refuerzo opcionalmente. Se aíslan los linfocitos de animales que producen anticuerpos anti-antígeno. De forma alternativa, se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*.

Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986). Las células de mieloma que se pueden usar son las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. Se han descrito también líneas celulares de mieloma humano y heteromioma murino-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células carentes de HGPRT. Preferentemente, se usan procedimientos de cultivo de células de hibridoma sin suero para reducir el uso de suero derivado de animales tal como suero fetal bovino, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo estándar se enriquecen con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizado de proteínas, y la apoptosis se puede suprimir significativamente por oligopéptidos sintéticos, constituidos por tres a seis residuos de aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se puede someter a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo de células que comprende uno o más componentes en los medios seleccionados del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, anserina, hidroxianisol butilado, carnosina, ácido lipoico e hidrato de quercitrina. En algunos aspectos de la divulgación, el uno o más componentes en los medios es hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se selecciona del grupo que consiste en S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina.

Los anticuerpos se pueden producir usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-antígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que

se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

5 (iii) Determinados procedimientos de cribado de colecciones

Los anticuerpos se pueden preparar mediante el uso de colecciones combinatorias para cribar para seleccionar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para seleccionar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se describen en general en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un procedimiento de generación de anticuerpos de interés es a través del uso de una colección de anticuerpos en fagos como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

15 En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan cribando colecciones de fagos que contienen fagos que muestran diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionada a la proteína de la cubierta del fago. Dichas colecciones de fagos se analizan mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv que se pueden unirse al antígeno deseado se adsorben en el antígeno y, por tanto, se separan de los clones de la colección que no se unen. Los clones de unión se eluyen a continuación del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de interés se puede obtener diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

20 En determinados modos de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de la cadena ligera (VL) y una de la cadena pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fago, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están enlazadas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o bien como fragmentos Fab, en los que están fusionados cada uno con un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

35 Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden examinar para determinar clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando los segmentos de genes de V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contengan una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 (1992).

40 En determinados modos de realización, el fago filamentoso se usa para presentar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de recubrimiento se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de cubierta naturales, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

45 En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias obtenidas de humanos o animales. Si se desea una colección sesgada en favor de clones anti-antígeno, se inmuniza al sujeto con antígeno para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan las células del bazo y/o linfocitos B en circulación u otros linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de colecciones. En un modo de realización se obtiene una colección de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de los clones anti-antígeno generando una respuesta de anticuerpos anti-antígeno en ratones transgénicos que portan una micromatriz genética de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de modo que la inmunización con antígeno dé lugar

a linfocitos B que producen anticuerpos humanos frente al antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

5 Se puede obtener un enriquecimiento adicional en cuanto a las poblaciones celulares reactivas anti-antígeno usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad por antígeno o adsorción de células sobre antígeno marcado con fluorocromo seguida de separación celular activada por flujo (FACS).

10 De forma alternativa, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una colección de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que el antígeno no sea antigénico. Para colecciones que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se obtienen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de una variedad de especies animales, tales como las especies humana, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

20 Los segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de genes de VH y VL reordenados, se puede obtener el ADN deseado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coincidan con los extremos 5' y 3' de genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo repertorios diversos de genes de V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con los cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y los
25 cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificación a partir de ADNc, los cebadores inversos también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar redundancia en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En determinados modos de realización, la diversidad de las colecciones se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks *et al.* *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en
35 vectores de expresión se pueden introducir sitios de restricción infrecuentes dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

40 Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y mapeado (informado en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluidas todas las conformaciones principales de los bucles H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencia y longitud diversas como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 (1992). También se pueden
45 preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos humanos Vk y Vλ se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gama de pliegues VH y VL, y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes de V, se pueden reordenar *in vitro* segmentos de genes V de la línea germinal de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 (1992).

55 Los repertorios de fragmentos de anticuerpos se pueden construir combinando los repertorios de genes VH y VL juntos de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la colección impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin exposición previa se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. A continuación, se combinan las dos colecciones mediante infección por fagos de bacterias que contienen fagémidos, de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la colección esté limitado únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas
60 inmensas colecciones proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

De forma alternativa, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o se pueden ensamblar juntos por PCR y a continuación se pueden clonar, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).
 5 También se puede usar ensamblaje por PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más se usa "ensamblaje por PCR en células" para combinar genes VH y VL en linfocitos mediante PCR y, a continuación, repertorios de clones de genes enlazados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

10 Los anticuerpos producidos por las colecciones sin exposición previa (naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de colecciones secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación se puede introducir al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (informada en Leung *et al.*, *Technique* 1: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente,
 15 la maduración de la afinidad se puede realizar mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que abarcan la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para seleccionar clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para determinar la afinidad más alta en varias tandas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con
 20 afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

El cribado de las colecciones se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el antígeno se puede usar para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, se puede expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la separación celular, o se puede conjugar a biotina para la captura con
 30 microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento para seleccionar colecciones de presentación en fagos.

Las muestras de las colecciones en fagos se ponen en contacto con el antígeno inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las
 35 condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competencia antigénica, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competencia antigénica de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).
 40 Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una sola tanda de selección. Además, se pueden cultivar los fagos enriquecidos en cultivos bacterianos y someterse a nuevas tandas de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si
 45 múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo fago pueden interactuar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la nueva unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.* 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos en fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por
 55 ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración de afinidad) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayor parte al antígeno, y unos pocos con afinidad más alta. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana por el antígeno. Los fagos de alta afinidad de unión se pueden capturar a continuación por microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más alta de un gran exceso de fagos con afinidad más baja. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar basándose en la cinética de disociación.
 60

65 Los clones anti-antígeno se pueden seleccionar basándose en la actividad. En el presente documento se divulgan

anticuerpos anti-antígeno que se unen a células vivas que expresan naturalmente el antígeno o se unen al antígeno flotante libre o al antígeno unido a otras estructuras celulares. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-antígeno se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-antígeno de una colección de fagos como se describe anteriormente y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando el antígeno y una segunda proteína frente a la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago anti-antígeno sobre el antígeno inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a antígeno que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas se pueden enriquecer adicionalmente repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en el presente documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de interés se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud parcial o completa. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y, a continuación, fusionado a ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. Un clon Fv derivado de ADN variable humano se puede fusionar a ADN de la región constante humano para formar secuencia(s) codificante(s) para las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa humanas.

También se puede modificar ADN que codifica anticuerpos anti-antígeno derivados de un hibridoma, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Se puede modificar adicionalmente ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de clones Fv o de hibridoma mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon Fv o anticuerpos derivados de clones de hibridoma de interés.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Se conocen en la técnica diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las CDR o secuencias de CDR de roedor. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias conocidas de dominio variable humano. A continuación, se acepta la secuencia humana que es la más próxima a la del roedor como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo

particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

5 Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con el procedimiento divulgado en el presente documento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

20 Los anticuerpos humanos de interés se pueden construir combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionada(s) de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) de dominio constante humanas conocida(s) como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de interés mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

30 Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz genética de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature* 355:258 (1992).

40 También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítipo", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo regula (sella) la elección del ligando de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril de 1993). 50 A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

(v) Fragmentos de anticuerpo

55 Se pueden generar fragmentos de anticuerpo mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

60 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. 65 Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo por tanto una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden

aislar de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semividada *in vivo* incrementada que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor de rescate se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185 y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv se pueden construir para proporcionar la fusión de una proteína efectora en el extremo amínico o bien carboxílico de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión a al menos dos epítopos diferentes, donde los epítopos son normalmente de diferentes antígenos. Si bien dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos epítopos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcB), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están englobados en esta expresión cuando se usan en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica son conocidos procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH₂ y CH₃. Es típico que la primera región constante de la cadena pesada (CH₁) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido cuando proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En un aspecto de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina y el otro a biotina. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito de sodio que forma complejos con ditiol para estabilizar los ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tuft *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Anticuerpos de dominio único

En algunos modos de realización, un anticuerpo de interés es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En un modo de realización, un anticuerpo de dominio único consiste en todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

(viii) Variantes de anticuerpos

En algunos modos de realización se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se prepara esa secuencia.

(B) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Los anticuerpos producidos por una célula cultivada en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento también se pueden producir usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-antígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

Un anticuerpo se puede producir de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que la célula huésped reconoce y procesa (por ejemplo, escinde con una peptidasa señal). Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan una secuencia señal natural del anticuerpo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor α (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

(ii) Origen de la replicación

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para aceptar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tales como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican células transformadas con el gen DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

De forma alternativa, las células transformadas con el gen GS se identifican cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Mtx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede usar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De forma alternativa, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, el gen DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 µm pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De forma alternativa, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology* 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión estables de múltiples copias para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen en general un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está enlazado de forma funcional al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariontes incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada de forma funcional al ADN que codifica un anticuerpo.

Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo a partir de vectores en células huésped de mamíferos se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, virus de simio 40 (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la patente de EE. UU. n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el papilomavirus bovino como un vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma

alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

5 La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo por eucariotas superiores se incrementa a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar al vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

15 (vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc de eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

25 (vii) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Los anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly *et al.*), la patente de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células de CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de cerveza, es el usado más habitualmente entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, *supra*.

5 Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una variedad de cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 del VPN de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del VPN de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como virus en el presente documento, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

15 Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate lenteja de agua (*Leninaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

20 Las células de vertebrados se pueden usar como huéspedes, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son 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 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-1587); 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); linfocitos 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). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pág. 255-268.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Crecimiento de las células y producción de polipéptidos

45 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 de crecimiento de las células, mantenimiento y/o producción de polipéptidos. Los procedimientos de cultivar una célula y producir un polipéptido emplean un recipiente de cultivo (biorreactor) para contener 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, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica. Las condiciones de cultivo que se pueden ajustar durante el procedimiento de cultivo incluyen, pero no se limitan a, pH y temperatura.

55 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.

60 La temperatura del cultivo de células en la fase de crecimiento inicial se seleccionará principalmente basándose en el 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 dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C. Preferentemente, las células de mamífero se cultivan bien dentro del 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 invención, 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 dentro de 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 una cantidad 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 finalmente 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, de la temperatura a la que se cultivan las células y de la tasa de crecimiento intrínseca 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 para incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes en las células. 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, pero sin limitarse a, de 1 a 4 días, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 días, y en condiciones tales que el crecimiento de las células sea 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 un medio de cultivo base proporcionado en el presente documento y las células al recipiente de cultivo en lotes. El medio de cultivo en un aspecto contiene menos de aproximadamente un 5 % o menos de un 1 % o menos de un 0,1 % de suero y otras proteínas derivadas de animal. Sin embargo, si se desea, se pueden usar suero y proteínas derivadas de animal. 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 va seguida 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 dentro de un intervalo de 25 °C a 38 °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 subproductos metabólicos cuando se usa en un procedimiento para 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 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 para 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 para 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 38 °C, de 32 °C a 38 °C, de 33 °C a 38 °C, de 34 °C a 38 °C, de 35 °C a 38 °C, de 36 °C a 38 °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 deseados. 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 hasta alguna concentración antes de obtener el cultivo.

En determinados casos, puede ser beneficioso o necesario complementar 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 complementar 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 complementar el cultivo de células antes de la fase de producción posterior. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario complementar 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.

Un componente proporcionado en el presente documento (por ejemplo, hipotaurina o un análogo o precursor de la misma) se puede añadir al medio de cultivo de células en cualquier momento durante el ciclo de cultivo de células. Por ejemplo, se puede añadir hipotaurina uno o más de los días 0-14 para un ciclo de cultivo de células de 14 días (por ejemplo, uno o más de los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14) en cualquier cantidad para proporcionar un medio de cultivo de células que comprende hipotaurina a una concentración proporcionada en el presente documento (por ejemplo, al menos 0,0001 mM). Por lo tanto, se aprecia que, para un ciclo de cultivo de células de 14 días, se puede añadir hipotaurina uno o más de los días 0-14 (por ejemplo, uno o más de los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14) en cualquier cantidad. Como se usa en el presente documento, el "día 0" se puede referir a un medio de cultivo de células que se ha complementado con un componente proporcionado en el presente documento (por ejemplo, hipotaurina) antes de que el medio de cultivo de células se haya aplicado al cultivo de células. Se entiende que un ciclo de cultivo de células puede ser cualquier cantidad de días, siempre y cuando las células permanezcan viables y/o se produzcan niveles suficientes de polipéptido como puede determinar un experto en la técnica. Por ejemplo, un ciclo de cultivo de células puede ser de al menos 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 o 20 días de duración. En algunos modos de realización, la hipotaurina se añade al medio de cultivo de células al menos un día de un ciclo de cultivo de células.

Purificación de polipéptidos

El polipéptido de interés se recupera preferentemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, 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. Después de esto, el polipéptido se puede purificar de proteínas y polipéptidos solubles 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 polipéptidos 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). Para anticuerpos, la idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Las proteínas purificadas se pueden concentrar para proporcionar una especialidad farmacéutica de proteína concentrada como se describe en el presente documento, por ejemplo, una con una concentración de proteínas de al menos 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml o una concentración de aproximadamente 1 mg/ml o 10 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml o 100 mg/ml o 125 mg/ml o 150 mg/ml. Se entiende que los productos de polipéptidos concentrados se pueden concentrar hasta niveles 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.

5 *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 de las células cultivadas en los medios detallados en el presente documento, purificar el polipéptido 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 1 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml o 150 mg/ml de polipéptido, tal como un anticuerpo). 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 ciclos 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, 7ª 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 3. Como se 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 entendería 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.

En algunos modos de realización, la intensidad de color se determina usando el ensayo de color total. Véase, por ejemplo, Vijayasankaran *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 29:1270-1277, 2013. Para el ensayo de color total, se deriva 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*, 3ª edición. Nueva York, NY, John Wiley & Sons, Inc., (2000). En resumen, después de calibrar con agua, se mide 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 convierte 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). L*a*b* es un espacio de color tridimensional con una separación aproximadamente uniforme en la percepción visual. El espacio de color L*a*b* puede cuantificar las diferencias en la apreciación visual de los colores. Por ejemplo, dos soluciones que se considera visualmente que tienen colores muy diferentes estarán más separadas en el espacio de color L*a*b* en comparación con dos soluciones que tienen un color similar, que estarán más juntas dentro del espacio de color L*a*b*. Dentro del espacio tridimensional L*a*b*, la distancia entre puntos se calcula como la euclidiana entre los puntos (ΔE). Esto permite medir la ΔE entre puntos en el espacio de color L*a*b* y correlacionar esta distancia con la apreciación de percepción visual de las diferencias de color. Una ΔE grande representa dos soluciones de colores muy diferentes, y una ΔE pequeña representa dos soluciones de color similar. La transformación del espectro de absorción en espacio de color L*a*b* requiere un iluminante definido. Por ejemplo, se puede usar un espectro plano artificial en la región visible como iluminante. En algunos modos de realización, el "color total" puede representar la ΔE que se corresponde 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" puede representar el color global de la muestra de anticuerpo monoclonal de prueba sin diferenciar entre tonos distintos. La medición del color total se puede normalizar al valor medido para un patrón de referencia. Por ejemplo, el valor de intensidad de color se determina 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 $\leq B5$.

La intensidad del color también se puede determinar usando el ensayo NIFTY (herramienta de fluorescencia intrínseca normalizada para proteínas amarillas/marrones). En este ensayo, la fluorescencia de la molécula de anticuerpo se usa como sustituto del color, ya que se ha demostrado que la intensidad del color y la intensidad de fluorescencia correlacionan bien en el conjunto de proteínas A ($R^2=0,84$). Véase Vijayasankaran *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 27:1270-1277 (2013). El valor numérico NIFTY más alto indica una intensidad de color más alta y el valor numérico NIFTY más bajo indica una intensidad de color más baja. Se analizan aproximadamente de 50 a 125 μg de muestras de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una columna G3000SWXL (TOSOH), con un caudal isocrático de 0,5 ml/min. La fase móvil para SEC es fosfato de potasio 0,2 M, cloruro de potasio 0,25 M, pH 6,2. La temperatura de la columna se controla a 15 °C. Por ejemplo, se puede supervisar 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. Estas longitudes de onda se eligen basándose en la fuerte correlación, así como en la respuesta de fluorescencia máxima observada con estas longitudes de onda. Los picos de SEC de las especies de anticuerpos monoclonales se integran usando el programa informático Agilent Chemstation en relación con cromatogramas de absorbancia UV y de emisión de fluorescencia. Para cada muestra de anticuerpo monoclonal se determina 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 corrige la respuesta de fluorescencia mediante la contribución de masa de anticuerpo. El valor de intensidad de color se determina 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 (por ejemplo, una muestra que contiene una lectura de COC de $\leq B5$). Como el requisito de muestra para NIFTY es pequeño, es útil como sustituto del color cuando el volumen de cultivo es limitado.

El valor NIFTY se puede calcular como se muestra a continuación. F = Área de pico en el cromatograma de fluorescencia; U = Área de pico en el cromatograma de absorción UV; i = variable; S = muestra; R = referencia.

$$\frac{F_i}{U_i} = \text{Fluorescencia normalizada respecto a la concentración de anticuerpos}$$

5

$$\frac{\frac{F_s}{U_s}}{\frac{F_R}{U_R}} = \text{Fluorescencia relativa (valor NIFTY)}$$

Tabla 3. Valores de patrones de referencia ejemplares

Patrón de referencia	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 B1 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 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.

Patrón de referencia	Valor de patrón de referencia
	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 algunos modos de realización, se puede realizar el ensayo cuantitativo usando un procedimiento automatizado. En algunos modos de realización, un valor más alto (por ejemplo, un valor numérico más alto) proporcionado por el ensayo cuantitativo indica una intensidad de color más alta y un valor más bajo (por ejemplo, un valor numérico 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.

IV. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

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 (por ejemplo, un anticuerpo) deseado. Una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) puede secretar el polipéptido en un medio de cultivo de células durante el cultivo de células. En consecuencia, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender una célula que produce el polipéptido y un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento en el que se secreta el polipéptido. También se contemplan composiciones que comprenden el polipéptido producido y un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, una composición comprende (a) una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporcionan en el presente documento. En algunos aspectos, la composición comprende (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento, en el que el polipéptido se secreta en el medio por una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. En otros aspectos, la composición comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células como se proporciona en el presente documento, en el que 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 comprende uno o más compuestos como se detalla en la tabla 1 o tabla 2. Asimismo, el polipéptido de la composición puede ser cualquier polipéptido detallado en el presente documento, tal como un anticuerpo. En algunos aspectos, la composición puede tener un color. En algunos modos de realización, 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, 7ª ed. P.22. En consecuencia, en algunos modos de realización, se evalúa en cuanto a la intensidad de color una composición que comprende (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento. En otro modo de realización, el polipéptido se aísla y/o purifica antes de evaluar la intensidad del color. En algunos modos de realización, una intensidad de color de una composición que comprende (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se usa para predecir la intensidad de color de la composición proteica final. Por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido y un medio de cultivo de células proporcionado en el presente documento se mide en cuanto a la intensidad de color usando el ensayo de COC como se describe en el presente documento. Si el valor de intensidad de color es mayor que B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9, entonces hay una probabilidad incrementada de que la composición proteica final tenga un valor de intensidad de color mayor que B3, B4, B5, B6, B7, B8 o B9. En algunos modos de realización, la composición que comprende un polipéptido y el medio de cultivo de células se somete a al menos una etapa de purificación antes de la medición de la intensidad de color. En algunos modos de realización, la composición proteica final es una formulación farmacéutica. En algunos

aspectos, una composición como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml o 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, 10 mg/ml o 25 mg/ml o 50 mg/ml o 75 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunos aspectos, 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.

Las composiciones (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas) de los polipéptidos (por ejemplo, un polipéptido terapéutico) 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* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables no son en general tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones, antioxidantes, conservantes, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas; polímeros hidrófilos; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, agentes quelantes, azúcares, contraiones formadores de sales, complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensoactivos no iónicos. 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. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación farmacéutica se administra a un mamífero tal como un ser humano. Las formulaciones farmacéuticas del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. 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). Las formulaciones farmacéuticas que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

En algunos aspectos, una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido terapéutico) a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, o 75 mg/ml, o a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml. En otros aspectos, una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido terapéutico) a una concentración de al menos aproximadamente 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml o 250 mg/ml, o a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 25 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml o al menos aproximadamente 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 modos de realización, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 125 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml o al menos aproximadamente 200 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 clara. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 25 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml o al menos aproximadamente 75 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color menor que un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color. En algunos aspectos, una formulación farmacéutica como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido a una concentración mayor de al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 125 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml o al menos aproximadamente 200 mg/ml y tiene un valor de intensidad de color que de un valor de intensidad de color de una solución de referencia medido mediante un ensayo de color. Por ejemplo, la intensidad de color de una composición (por ejemplo, formulación farmacéutica) que comprende un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido terapéutico) se puede reducir en al menos un 0,1 % o en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el polipéptido producido por una célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende el uno o más de los componentes de la tabla 1 o la tabla 2.

V. Artículos de fabricación o kits

Se describe un kit para complementar 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 para complementar un medio con los constituyentes del kit). El kit puede contener los constituyentes proporcionados en el presente documento en cantidades adecuadas para complementar un medio de cultivo de células. En algunos aspectos, el kit contiene uno o más constituyentes seleccionados del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, anserina, hidroxianisol butilado, carnosina, ácido lipoico e hidrato de quercitrina en cantidades para complementar un medio de cultivo de células con una concentración de constituyentes como se proporciona en la tabla 1 o en la tabla 2. En algunos aspectos de la divulgación, un kit comprende uno o más de: (a) hipotaurina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM de hipotaurina en el medio de cultivo de células; (b) S-carboximetilcisteína en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM de S-carboximetilcisteína en el medio de cultivo de células; (c) carnosina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 8,0 mM a aproximadamente 12,0 mM de carnosina en el medio de cultivo de células; (d) anserina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 3,0 mM a aproximadamente 5,0 mM de anserina en el medio de cultivo de células; (e) hidroxianisol butilado en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 0,040 mM de hidroxianisol butilado; (f) ácido lipoico en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,040 mM a aproximadamente 0,060 mM de ácido lipoico en el medio de cultivo de células; (g) hidrato de quercitrina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,010 mM a aproximadamente 0,020 mM de hidrato de quercitrina en el medio de cultivo de células; y (h) aminoguanidina en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,0003 mM a aproximadamente 10 mM de aminoguanidina en el medio de cultivo de células. En algunos aspectos, el kit contiene uno o más constituyentes, en el que el uno o más constituyentes es hipotaurina o un análogo o precursor de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, la hipotaurina o un análogo o precursor de la misma se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina. En algunos aspectos de la divulgación, un kit para complementar un medio de cultivo de células con constituyentes definidos químicamente, comprendiendo el kit hipotaurina o un análogo o precursor de la misma a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM, y en el que la hipotaurina o un análogo o precursor se selecciona del grupo que consiste en hipotaurina, S-carboximetilcisteína, cisteamina, ácido cisteinsulfínico y taurina.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene el medio de cultivo de células divulgado en el presente documento y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos y bolsas. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene el medio de cultivo de células y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso (por ejemplo, para su uso en el cultivo de células). El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes y prospectos del envase con instrucciones para su uso.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención.

EJEMPLOS

Se han identificado medios que producen un producto proteico (por ejemplo, una especialidad farmacéutica de proteínas) con atributos de calidad aceptables, tales como intensidad de color reducida, en particular, cuando el producto proteico está presente como una solución concentrada (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml o al menos aproximadamente 100 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. Un medio puede, en un aspecto, comprender hipotaurina. En algunos de los aspectos proporcionados en el presente documento, los medios comprenden uno o más análogos de hipotaurina o precursores de la misma, tales como carboximetilcisteína. 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 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 en el presente documento, 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 o 150 mg/ml. Se contemplan, en particular, procedimientos de preparación y las composiciones que comprenden anticuerpos. También se describen kits para complementar un medio de cultivo de células con constituyentes químicamente definidos.

Ejemplo 1: identificación de compuestos antioxidantes que pueden reducir el color en las composiciones de anticuerpos.

Los compuestos que se ha informado que reaccionan con un oxidante se seleccionaron por su capacidad para reducir el color de las composiciones que contienen proteínas (tabla 4). Para el cribado de antioxidante, se preparó un volumen total de 40 ml de medio mezclando 1 parte de medio base 1 y 0,3 partes de medio de alimentación 2 para reflejar una proporción representativa de los medios usados en condiciones de cultivo de células (tabla 5). La mezcla de medio 1 y medio 2, que previamente se había demostrado que incrementaba la intensidad de color de las soluciones que contenían anticuerpos cuando se usaban para cultivar células productoras de anticuerpos, se complementó con uno de los 30 compuestos antioxidantes y se enriqueció con 2 g/l de anticuerpo monoclonal IgG1. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm durante un período de incubación de cinco días. Se incluyeron dos muestras de control en el ensayo de cribado: 1) una muestra de 40 ml de una mezcla de medio 1 y medio 2 que contiene 2 g/l de anticuerpo monoclonal IgG1 que se había incubado durante 5 días a 37 °C con agitación a 250 rpm sin antioxidante (control positivo), y 2) una muestra de 40 ml de una mezcla de medios preparada mezclando 1 parte de medio base 3 y 0,3 partes de medio de alimentación 4 (tabla 5), que previamente se había demostrado que reduce la intensidad de color de las soluciones que contienen anticuerpos cuando se usan para cultivar células productoras de anticuerpos, enriquecida con 2 g/L de anticuerpo monoclonal IgG1 e incubada durante 5 días a 37 °C con agitación a 250 rpm sin antioxidante (control negativo).

Tabla 4. Compuestos representativos cribados para la reducción de color

Antioxidante	IUPAC	Nº CAS	Concentración de prueba 1X
2,3-terc-butil-4-hidroxianisol	2-terc-butil-4-metoxifenol	25013-16-5	34,68 µM
2,6-di-terc-butil-4-metilfenol	2,6-di-terc-butil-4-metilfenol	97123-41-6	102,11 µM
ácido 3-aminopropano-1-sulfónico	ácido 3-aminopropano-1-sulfónico	3687-18-1	9,16 µM
Adenosilhomocisteína	S-(5'-desoxiadenos-5'-il)-L-homocisteína	979-92-0	10,41 µM
Anserina	ácido (2S)-2-(3-aminopropanamido)-3-(1-metil-1H-imidazol-5-il)propanoico; ácido nítrico	10030-52-1	4,12 mM
B-Alanina	ácido 3-aminopropanoico	107-95-9	9,16 mM
B-Caroteno	1,3,3-trimetil-2-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-tetrametil-18-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1-il]ciclohex-1-eno	7235-40-7	9,31 µM
Hidroxianisol butilado	2-terc-butil-4-metoxifenol	25013-16-5	31,62 µM
Hidroxitolueno butilado	2,6-di-terc-butil-4-metilfenol	128-37-0	124,80 µM
Carnosina	ácido (2S)-2-(3-aminopropanamido)-3-(1H-imidazol-5-il)propanoico	305-84-0	10,00 mM
Carvedilol	[3-(9H-carbazol-4-iloxi)-2-hidroxiopropil][2-(2-metoxifenoxi)etil]amina	72956-09-3	21,53 µM
Curcumina	(1E,4Z,6E)-5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,4,6-trien-3-ona	458-37-7	49,95 µM
Cisteamina	2-aminoetano-1-tiol	60-23-1	12,00 mM
Clorhidrato de cisteamina	cloruro de hidrógeno de 2-aminoetano-1-tiol	156-57-0	10,00 mM
Dexametasona	(1R,2S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-1-fluoro-14,17-dihidroxi-14-(2-hidroxiacetil)-2,13,15-trimetiltetraciclo[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}]heptadeca-3,6-dien-5-ona	50-02-2	9,56 µM
Disulfuro de dialilo	3-(prop-2-en-1-ilsulfanil)prop-1-eno	592-88-1	1,00 mM
DL-Lantionina	ácido 2-amino-3-[(2-amino-2-carboxietil)sulfanil]propanoico	3183-08-2	97,96 µM
DL-Tiorfan	Ácido 2-(2-bencil-3-sulfanilpropanamido)acético	76721-89-6	0,10 mM
Etoxiquina	6-etoxi-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolina	91-53-2	49,99 µM

ES 2 798 307 T3

Antioxidante	IUPAC	Nº CAS	Concentración de prueba 1X
Ácido gálico	ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico	149-91-7	14,11 µM
Sal de sodio del hidrato del ácido gentísico	2,5-dihidroxibenzoato de sodio	4955-90-2	2,84 mM
Glutati6n	ácido 2-amino-4-({1-[(carboximetil)carbamoil]-2-sulfaniletíl}carbamoil)butanoico	70-18-8	2,0 mM
Disulfuro de glutati6n	ácido 2-amino-4-[(2-[[2-(4-amino-4-carboxibutanamido)-2-[[[carboximetil]carbamoil]etil]disulfanil]-1-[[[carboximetil]carbamoil]etil]carbamoil]butanoico	27025-41-8	2,0 mM
Éster etílico de glutati6n reducido	ácido (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-1-[[[carboximetil]carbamoil]-2-sulfanilbutil]carbamoil]butanoico	92614-59-0	0,93 mM
Glicina	ácido 2-aminoacético	56-40-6	13,32 mM
Hidrocortisona	(1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-dihidroxi-14-(2-hidroxiacetil)-2,15-dimetiltetraciclo[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}]heptadec-6-en-5-ona	50-23-7	55,03 mM
Hipotaurina	2-aminoetano-1-sulfinato	300-84-5	9,16 mM
Sal de amonio del ácido iseti6nico	2-hidroxietano-1-sulfonato de amonio	57267-78-4	9,16 mM
Disulfuro de L-cisteína-glutati6n	ácido (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-2-[[[(2R)-2-amino-3,3-dihidroxiopropil]sulfanil]-1-[[[carboximetil]carbamoil]-2-sulfanilidenoetil]carbamoil]butanoico	13081-14-6	0,73 mM
Ácido L-cisteinsulfínico monohidrato	Hidrato de ácido (2R)-2-amino-3-[(R)-sulfino]propanoico	207121-48-0	9,15 mM
Ácido lipoico	ácido 5-[(3R)-1,2-ditiolan-3-il]pentanoico	1200-22-2	50,40 µM
Ácido lipoico reducido	ácido 6,8-disulfaniloctanoico	462-20-4	48,00 µM
Mercaptopropionilglicina	ácido 2-(2-sulfanilpropanamido)acético	1953-02-2	10,00 mM
Metionina	ácido 2-amino-4-(metilsulfanil)butanoico	59-51-8	5,00 mM
Metilenois(ácido 3-tiopropiónico)	ácido 3-(((2-carboxietil)sulfanil]metil)sulfanil)propanoico	4265-57-0	0,99 mM
Ácido oxálico	ácido oxálico	144-62-7	500,94 µM
Hidrato de quercetrina	2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[[[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi]-4H-cromen-4-ona	522-12-3	13,94 µM
Resveratrol	5-[(E)-2-(4-hidroxifenil]etenil]benceno-1,3-diol	501-36-0	98,58 µM
Ácido retinoico	ácido (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenoico	302-79-4	2,0 µM
S-carboximetil-L-cisteína	ácido (2R)-2-amino-3-[[[carboximetil]sulfanil]propanoico	638-23-3	10,00 mM
Selenio	selanilideno	7782-49-2	1,40 µM
Selenometionina	ácido (2S)-2-amino-4-(metilselanil)butanoico	3211-76-5	30,09 µM
Dietilditiocarbamato de plata	(dietilcarbamoil)sulfanuro de ion plata (1+)	1470-61-7	0,10 mM
Taurina	ácido 2-aminoetano-1-sulfónico	107-35-7	5,00 mM
Ácido tioláctico	amina del ácido 2-sulfanilpropanoico	79-42-5	10,00 mM

Antioxidante	IUPAC	N° CAS	Concentración de prueba 1X
Tricina	ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino}acético	5704-04-1	4,46 mM
Vitamina C	2-(1,2-dihidroxietil)-4,5-dihidroxi-2,3-dihidrofuran-3-ona	50-81-7	9,82 µM
Vitamina E	(2R)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetiltridecil]-3,4-dihidro-2H-1-benzopirán-6-ol	10191-41-0	27,86 µM

La concentración de prueba 1X indica la concentración final en los medios

Después de la incubación, el anticuerpo monoclonal se purificó usando cromatografía de afinidad. La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto purificado mediante el ensayo 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. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. De los 30 compuestos antioxidantes sometidos a prueba, se descubrió que varios compuestos, tales como el ácido genticónico, la cisteamina, la hidrocortisona y la mercaptopropionilglicina, incrementaban el color de la composición de anticuerpos (figura 1). En comparación, se descubrió que seis de los compuestos, tales como la hipotaurina, la anserina, el hidroxianisol butilado, la carnosina, el ácido lipoico y el hidrato de quercitrina, reducen el color de la composición de anticuerpos (figura 2). De los antioxidantes que redujeron la intensidad del color, la hipotaurina demostró el mayor efecto en la reducción de la intensidad de color de las composiciones que contienen anticuerpos en aproximadamente un 25 %. La taurina, un análogo de la hipotaurina, también redujo la intensidad de color en aproximadamente un 5 %.

Tabla 5. Componentes representativos en composiciones de medios sometidas a prueba

Componentes en los medios	Medio 1 (Base)	Medio 2 (Alimentación)	Medio 3 (Base)	Medio 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

Ejemplo 2: caracterización de compuestos antioxidantes que pueden reducir la intensidad de color en composiciones de anticuerpos aisladas de líneas celulares productoras de anticuerpos.

Se evaluó la capacidad de la hipotaurina para reducir la intensidad de color en las composiciones que contienen anticuerpos obtenidas directamente de cultivos de células. Para estos estudios se utilizó un modelo de cultivo de células en matraz agitador que resultó ser representativo del cultivo de células 2L a mayor escala. En resumen, para el modelo de cultivo de células en matraz agitador, se inocularon células CHO productoras de anticuerpos a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio base 1 o medio base 3. Para los cultivos de células 2L a mayor escala, se inocularon células CHO productoras de anticuerpos a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en biorreactores agitados de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) que contenían 1 l de medio base 1 o medio base 3. Para el modelo de crecimiento celular a mayor escala, las células se cultivaron en modo de lotes alimentados con la adición de 100 ml de medio de alimentación 2 si se cultivaron en medio base 1, o con 100 ml de medio de alimentación 4 si se cultivaron en medio base 3, por litro de caldo de cultivo de células los días 3, 6 y 9 para iniciar la fase de producción. Para el modelo de cultivo de células en matraz agitador, las células se cultivaron en modo de lotes alimentados con la adición de 10 ml de medio de alimentación 2 si se cultivaron en medio base 1, o con 10 ml de medio de alimentación 4 si se cultivaron en medio base 3, por litro de caldo de cultivo de células los días 3, 6 y 9 para iniciar 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 disminución de los niveles de glucosa. Los reactores estaban equipados con sondas calibradas de oxígeno disuelto, pH y temperatura. El oxígeno disuelto se controló en línea mediante rociado con aire

y/u oxígeno. Para el cultivo de células 2L a mayor escala, el pH se controló mediante la adición de CO₂ o Na₂CO₃ y se añadió antiespumante a los cultivos según fuera 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. Para los cultivos de células en matraz agitador, se colocaron los cultivos en un agitador de plataforma y se agitaron a 150 rpm en un incubadora de CO₂ al 5 % con una temperatura de 37 °C desde el día 0 hasta el día 3 del ciclo de cultivo de células, con un cambio de temperatura a 35 °C el día 4 hasta el final del ciclo de cultivo de células el día 14. Se supervisó la osmolalidad usando un osmómetro de Advanced Instruments (Norwood, MA). 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). El caldo de cultivo de células se recogió diariamente centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células para la determinación del valor de anticuerpos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Al final de la duración del cultivo de células el día 14, el caldo de cultivo de células de todas las muestras se recogió por centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad. La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto purificado mediante el ensayo 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 crecimiento medido por VCC (figura 3A) y viabilidad celular (figura 3B) fueron comparables entre los modelos de cultivo de células a mayor escala (2L) y en matraz agitador (SF), independientemente del medio usado. La producción de anticuerpos fue ligeramente menor en el modelo de cultivo de células en matraz agitador, con la producción de anticuerpos más alta observada en el modelo de cultivo de células a mayor escala incubado en medio 1 y medio 2 (figura 3C). La intensidad del color de las composiciones de anticuerpos obtenidas del modelo de cultivo de células en matraz agitador fue menor a un valor de 1,07 cuando se cultivaron en medio 3 y medio 4 en comparación con las composiciones de anticuerpos obtenidas de las composiciones de cultivo de células en matraz agitador cuando se cultivaron en medio 1 y medio 2, que tenían un valor de 2,25. Estos experimentos establecieron que el modelo en matraz agitador era comparable al modelo de cultivo de células 2L y era adecuado para su uso en experimentos posteriores.

Para la experimentación con composiciones de medios de cultivo de células que se complementaron con la hipotaurina antioxidante, se inocularon células CHO productoras de anticuerpos a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio base 1. El medio 1 se complementó con 9,16 mM (100%), 4,58 mM (50%) o 2,29 mM (25%) de hipotaurina para su uso en cultivo de células el día 0. Las células se cultivaron en modo de lotes alimentados con la adición de 10 ml del medio de alimentación 2 por litro de caldo de cultivo de células los días 3, 6 y 9 para el inicio de la fase de producción. Una muestra experimental adicional implicó la adición gradual de 9,16 mM de hipotaurina durante el período de cultivo de células. Específicamente, se añadió hipotaurina 2,29 mM (25%) el día 0 del cultivo de células en el medio base 1, y se añadió un 25 % el día 3, día 6 y día 9 en el medio de alimentación 2. Se incluyó un control positivo mediante el cultivo de células en los medios 1 y 2 sin complementación con hipotaurina. El control negativo se incluyó cultivando células cultivadas en medio 3 y medio 4 sin complementación con hipotaurina. Como se describe anteriormente, 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 los niveles de glucosa. 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 midieron diariamente la VCC y la viabilidad de las células usando un contador de células automatizado ViCell® (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El caldo de cultivo de células se recogió diariamente centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células para la determinación del valor de anticuerpos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Al final de la duración del cultivo de células el día 14, el caldo de cultivo de células de todas las muestras se recogió por centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad. La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto purificado mediante el ensayo 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. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. El crecimiento medido por VCC (figura 4A) y viabilidad celular (figura 4B) fue comparable entre todos los cultivos de células sometidos a prueba. Además, con la excepción de la adición incremental de hipotaurina, los cultivos de células cultivados en medios complementados con hipotaurina produjeron el mismo nivel de valores de anticuerpo que los cultivos de células cultivados en medios que no contenían hipotaurina (figura 4C). Se descubrió que la intensidad del color se redujo con una mayor concentración de hipotaurina, con la mayor reducción observada en medios que contenían hipotaurina 9,16 mM (figura 5). Esta reducción en la intensidad de color fue óptima cuando se añadió hipotaurina como un bolo el día 1 en lugar de añadirse de forma incremental durante el transcurso de la incubación del cultivo de células. La comparación de los valores de intensidad de color obtenidos a partir de experimentos de cultivo de células y experimentos de incubación (véase ejemplo 1) demostró que los resultados de los experimentos de cribado de incubación (figura 5, círculos vacíos) correlacionan bien con los resultados de los experimentos de cultivo de células (figura 5, círculos llenos).

Se llevaron a cabo experimentos similares para composiciones de anticuerpos aisladas de cultivos de células

obtenidos en medio base 3 y medio de alimentación 4 para determinar si el efecto reductor de color de la hipotaurina se extendía a otros medios de cultivo de células. En resumen, como anteriormente, se inocularon células CHO productoras de anticuerpos a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio base 3. El medio 3 se complementó con 12,95 mM (1X), 25,9 mM (2X) o 38,85 mM (3X) de hipotaurina para su uso en cultivo de células el día 0. Las células se cultivaron en modo de lotes alimentados con la adición de 10 ml del medio de alimentación 4 por litro de caldo de cultivo de células los días 3, 6 y 9 para el inicio de la fase de producción. Se incluyó un control positivo mediante el cultivo de células en los medios 1 y 2 sin complementación con hipotaurina. Los cultivos se colocaron en un agitador de plataforma y se agitaron a 150 rpm en un incubadora de CO₂ al 5 % con una temperatura de 37 °C desde el día 0 hasta el día 3 del ciclo de cultivo de células, con un cambio de temperatura a 35 °C el día 4 hasta el final del ciclo de cultivo de células el día 14. La osmolalidad, el pH fuera de línea y las concentraciones de metabolitos se midieron como se describe anteriormente. Se midieron diariamente la VCC y la viabilidad de las células usando un contador de células automatizado ViCell® (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El caldo de cultivo de células se recogió diariamente centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células para la determinación del valor de anticuerpos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Al final de la duración del cultivo de células el día 14, el caldo de cultivo de células de todas las muestras se recogió por centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad. La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto purificado mediante el ensayo 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. Los resultados numéricos se normalizaron al control positivo, donde el valor para el control positivo se estableció en un 0 % de cambio en la intensidad de color. Se descubrió que la intensidad del color se redujo con una mayor concentración de hipotaurina, con la mayor reducción observada en medios que contenían hipotaurina 38,85 mM (figura 6).

Ejemplo 3: caracterización de análogos de hipotaurina en la reducción de color en composiciones de anticuerpos aisladas de líneas celulares productoras de anticuerpos.

Los análogos de hipotaurina se sometieron a prueba para evaluar si demostraban un efecto reductor del color en las composiciones que contenían anticuerpos. Las células CHO productoras de anticuerpos se inocularon a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml en biorreactores agitados de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) que contenían 1 litro de medio base 1 complementado con hipotaurina 12,95 mM o carboximetilcisteína 10 mM (número CAS 638-23-3). Las células se cultivaron en modo de lotes alimentados con la adición de 100 ml del medio de alimentación 2 por litro de caldo de cultivo de células los días 3, 6 y 9 para el inicio de la fase de producción. Se incluyó un control positivo mediante el cultivo de células en los medios 1 y 2 sin complementación con hipotaurina. La concentración de glucosa se analizaba cada día y, si la concentración de glucosa disminuía por debajo de 2 g/l, se reponía a partir de una solución madre de 1,5 g/l de glucosa para prevenir la reducción de los niveles 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). 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 VCC y la viabilidad de las células usando un contador de células automatizado ViCell® (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El caldo de cultivo de células se recogió diariamente centrifugando 1 ml de caldo de cultivo de células para la determinación del valor de anticuerpos usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Al final de la duración del cultivo de células el día 14, cuando la cantidad de proteína en el cultivo era de aproximadamente 2-10 g/l, se recogió el caldo de cultivo de células de todas las muestras mediante centrifugación. El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido se purificó usando cromatografía de afinidad con proteína A. El conjunto de proteínas A se concentró a 150 g/l usando los dispositivos con filtro centrífugo Amicon Centricon (Millipore Corporation, Billerica, MA). La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto de proteína A concentrada usando dos ensayos diferentes en los que los valores numéricos más altos indicaban una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indicaban una intensidad de color más baja. El crecimiento medido por VCC (figura 7A) y viabilidad celular (figura 7B) fue comparable entre todos los cultivos de células sometidos a prueba. Los cultivos de células cultivados en medios complementados con hipotaurina o carboximetilcisteína produjeron niveles comparables de valores de anticuerpos (figura 8). Usando un ensayo de color específico, se descubrió que la intensidad de color de la composición de anticuerpos aislados se redujo en un 27 % y 13 % cuando las células productoras de anticuerpos se cultivaron en medios complementados con hipotaurina y carboximetilcisteína, respectivamente (figura 9A). Esta reducción de la intensidad de color se confirmó mediante el uso de un segundo ensayo de color que detectó una reducción de la intensidad de color de aproximadamente un 17 % y un 13 % en las composiciones de anticuerpos aisladas de células cultivadas en medios complementados con hipotaurina y carboximetilcisteína, respectivamente (figura 9B).

Ejemplo 4: caracterización de aminoguanidina en la reducción de color en composiciones de anticuerpos aisladas de líneas celulares productoras de anticuerpos.

ES 2 798 307 T3

5 Para identificar un compuesto que se reduce el color en composiciones de anticuerpos y funciona en condiciones de cultivo de células, se realizó un ensayo de detección en medio libre de células. Se seleccionaron taurina, carnosina y aminoguanidina para el cribado. Estos compuestos se disolvieron en 25 ml de medio de cultivo a la concentración de 1,2 g/l (taurina), 13,6 g/l (carnosina) y 27,2 g/l (clorhidrato de aminoguanidina). Después de ajustar el pH a un intervalo de 6,8 a 7,2 y la filtración estéril con unidades de filtro Steriflip (Millipore, Billerica, MA), la solución se incubó en tubos Falcon de 50 ml (BD Biosciences, San Jose, CA) equipados con tapas TubeSpin (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza). Las células CHO se incubaron durante 7 días en una incubadora de cultivo de células con humedad controlada a 37 °C y 250 rpm sin protección contra la luz para producir el anticuerpo monoclonal.

10 El anticuerpo monoclonal en el caldo de cultivo de células obtenido (HCCF) y el caldo de incubación se purificó adicionalmente con cromatografía de afinidad. La intensidad de color de la composición de anticuerpos concentrados se midió en el conjunto purificado mediante el ensayo en el que los valores numéricos más altos indicaban una intensidad de color más alta y los valores numéricos más bajos indicaban una intensidad de color más baja.

15 La figura 10 muestra la intensidad de color relativa para los anticuerpos producidos en medio de cultivo que contiene taurina, carnosina o aminoguanidina. Los datos indicaron que la aminoguanidina pudo disminuir el color en aproximadamente un 71 %, y el valor de intensidad de color relativa fue incluso menor que el valor para el control negativo en el que el anticuerpo se incubó sin glucosa.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o un fragmento del mismo producido recombinantemente que comprende la etapa de cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo en un medio de cultivo de células, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se secreta en el medio de cultivo de células, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina;
- 10 y en el que el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula en comparación con una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por las células en al menos aproximadamente un 0,1 % en comparación con una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo de células que comprende hipotaurina reduce la intensidad de color de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por las células en de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en comparación con una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo producido por la célula cultivada en un medio de cultivo de células que no comprende hipotaurina.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el medio de cultivo de células comprende hipotaurina a una concentración de aproximadamente 2,0 mM a aproximadamente 50,0 mM.
- 35 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el medio de cultivo de células comprende la hipotaurina
- a) a una concentración de al menos aproximadamente 0,0001 mM; o
- b) a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 500,0 mM, o
- 40 c) a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 40,0 mM; o
- d) a una concentración de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 10,0 mM.
- 45 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio de cultivo de células es un medio de cultivo de células químicamente definido.
- 50 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medio de cultivo de células es
- a) un medio de cultivo de células base; o
- b) un medio de cultivo de células de alimentación.
- 55 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la célula se pone en contacto con el medio de cultivo de células
- a) durante la fase de crecimiento de la célula; y/o
- b) durante la fase de producción de la célula.
- 60 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la hipotaurina se añade al medio de cultivo de células
- a) al menos un día de un ciclo de cultivo de células; o
- b) el día 0 de un ciclo de cultivo de células de 14 días.
- 65 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la célula es una célula de mamífero.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 5 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además la etapa de recuperar el anticuerpo o fragmento del mismo del medio de cultivo de células que comprende uno o más de los componentes (a)-(b).
- 10 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo recuperado
- a) es una composición líquida; y/o
- 15 b) aparece como un líquido incoloro o ligeramente coloreado.

Figura 1

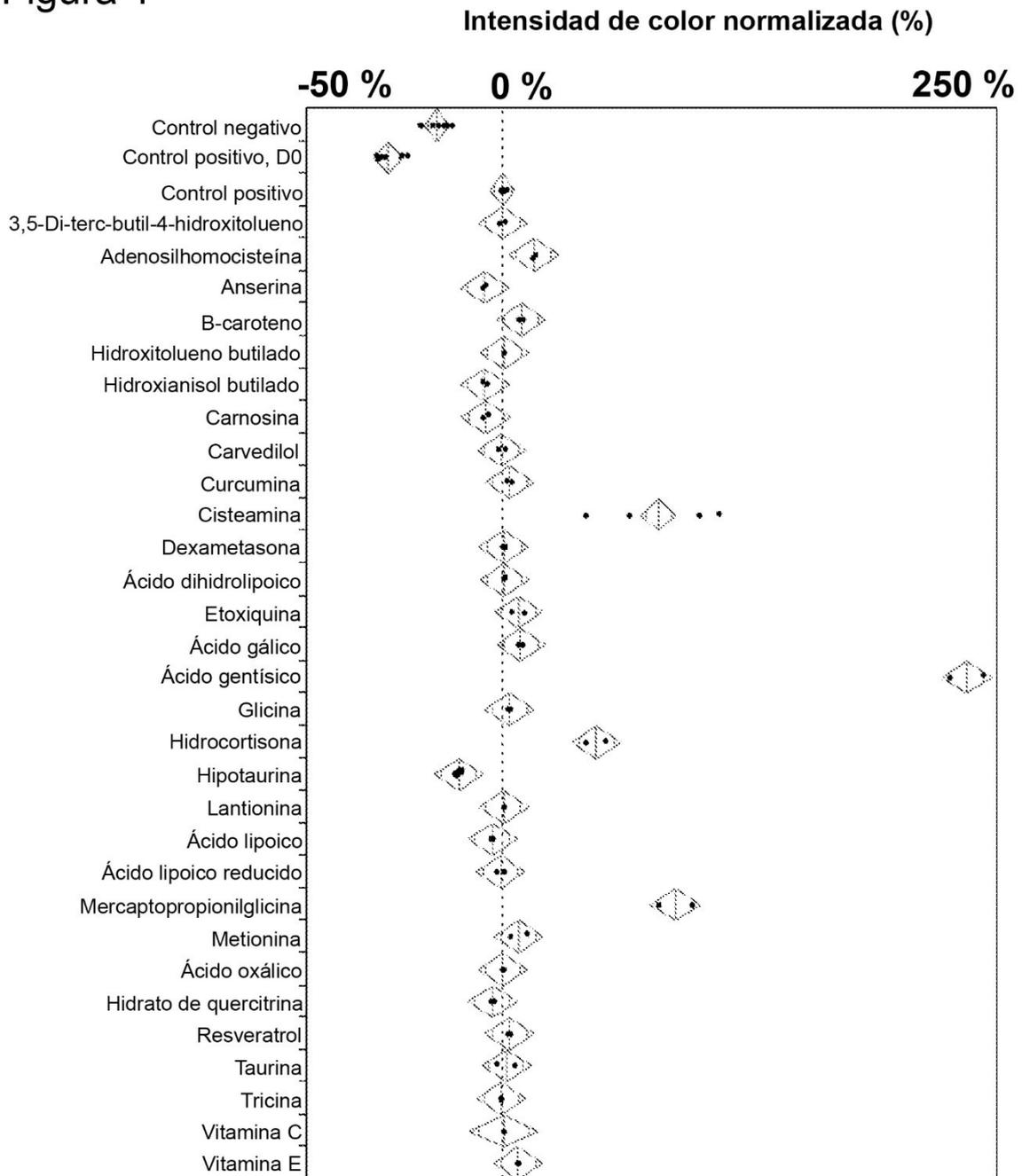


Figura 2

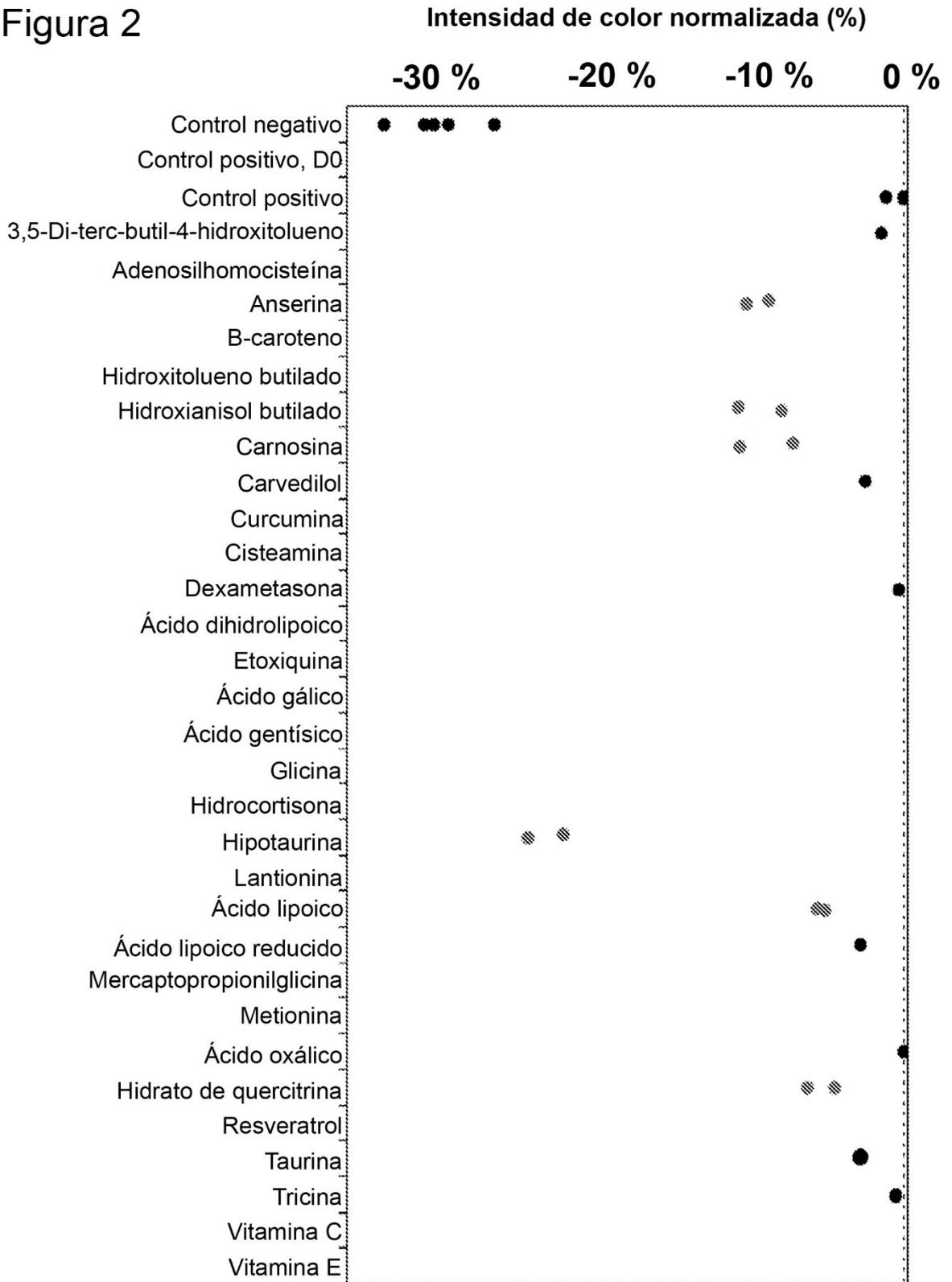


Figura 3

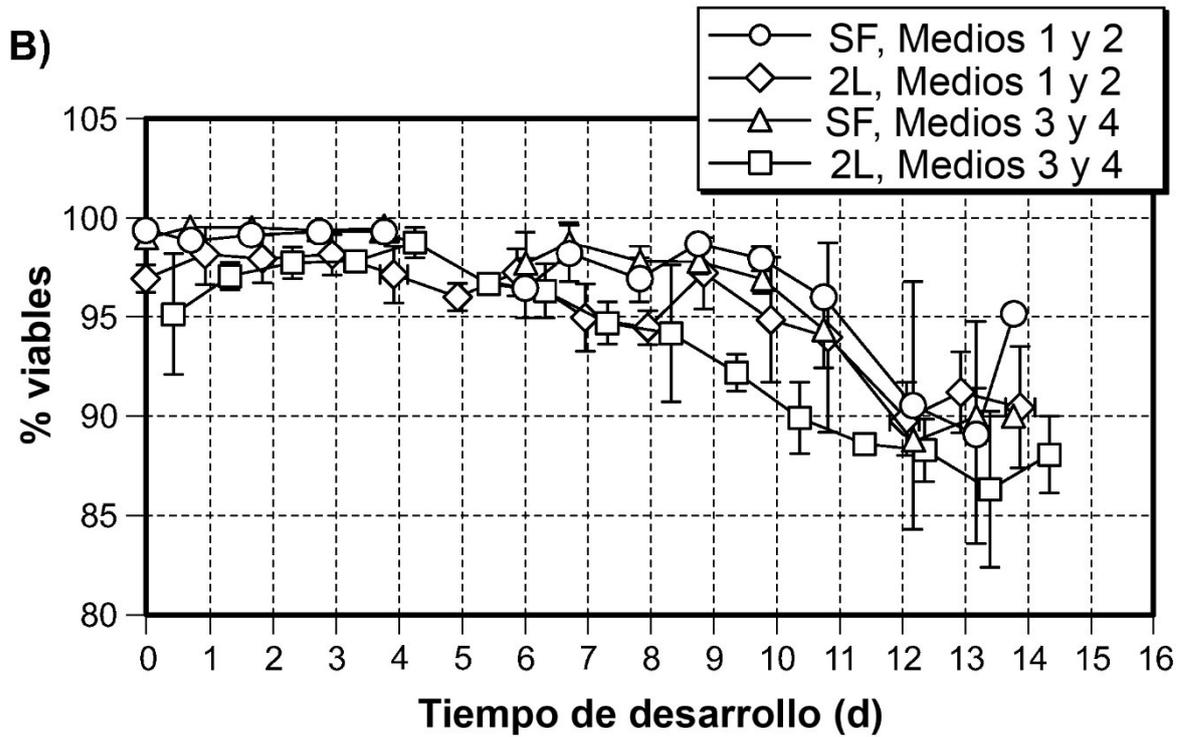
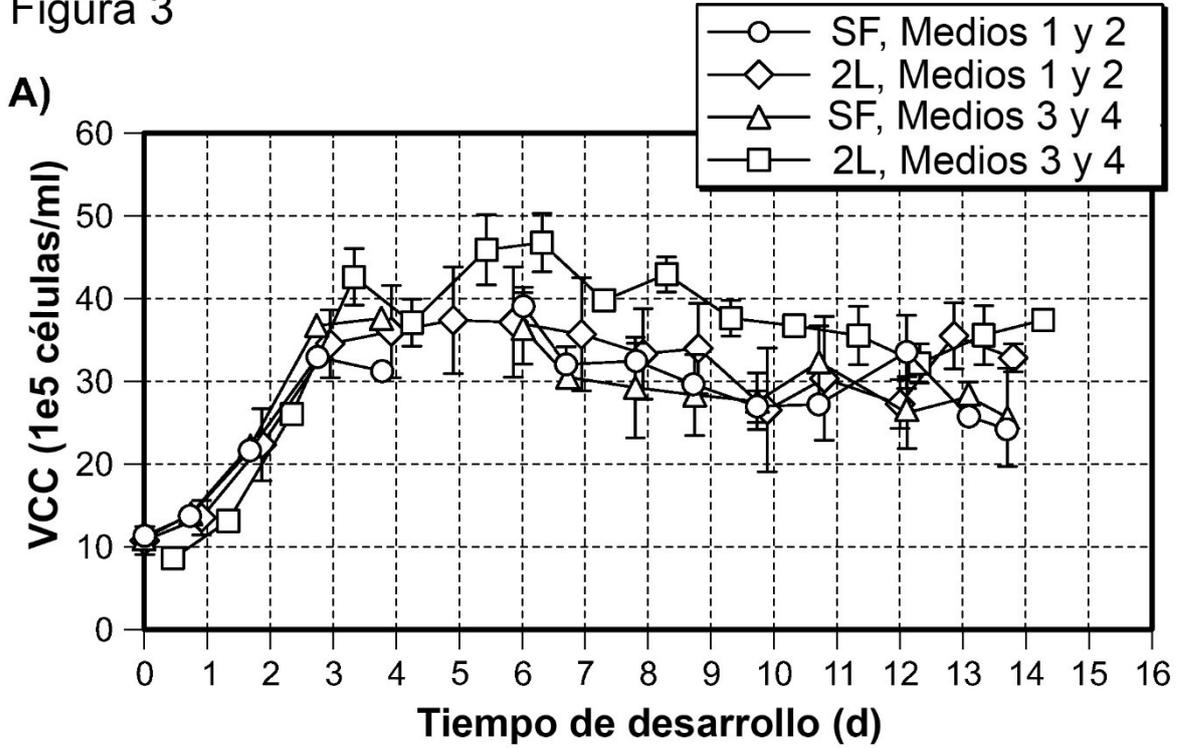


Figura 3

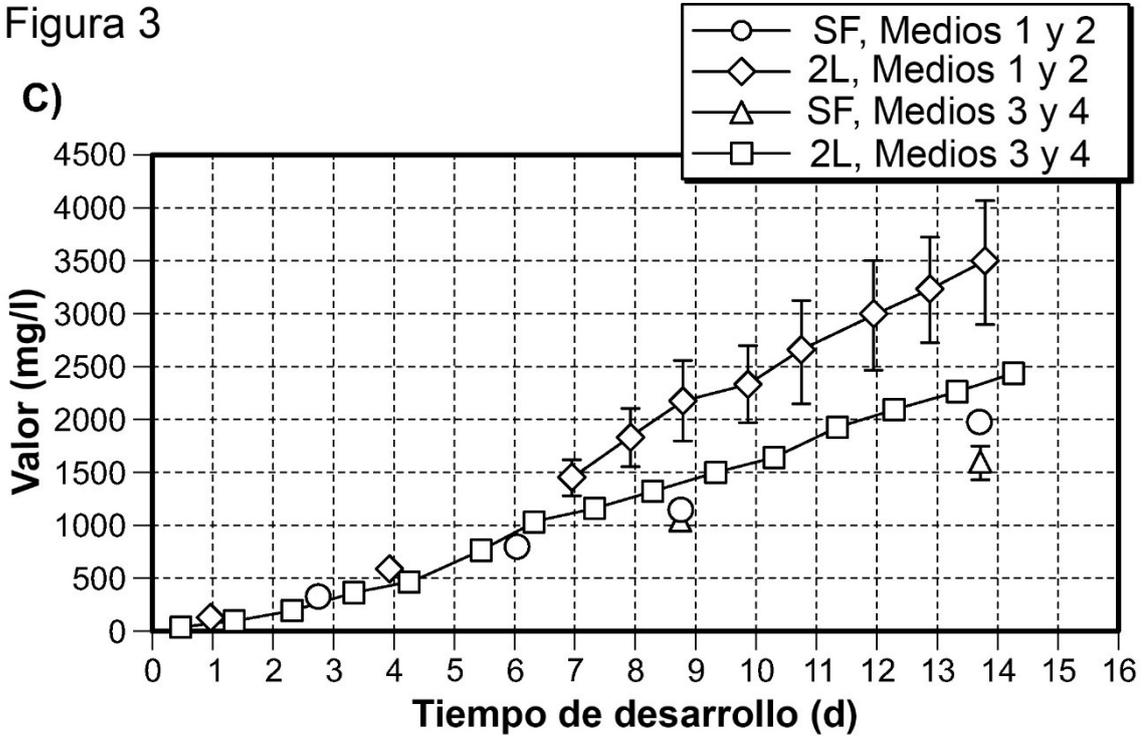


Figura 4

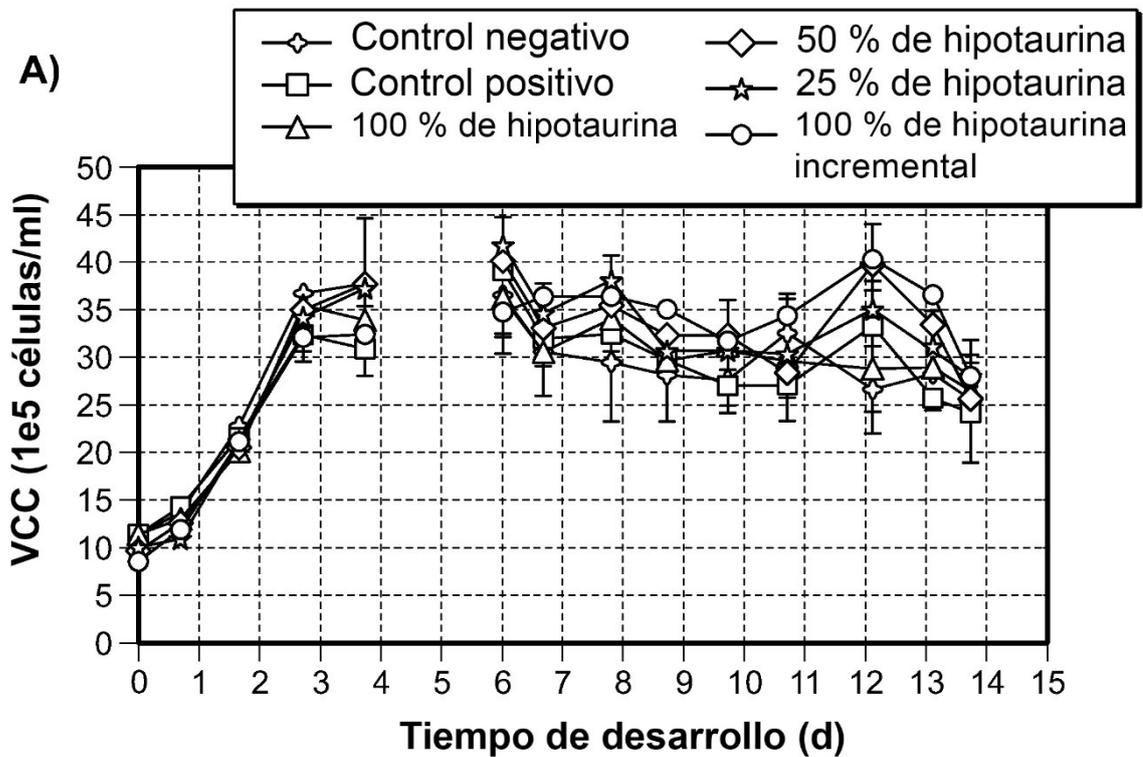
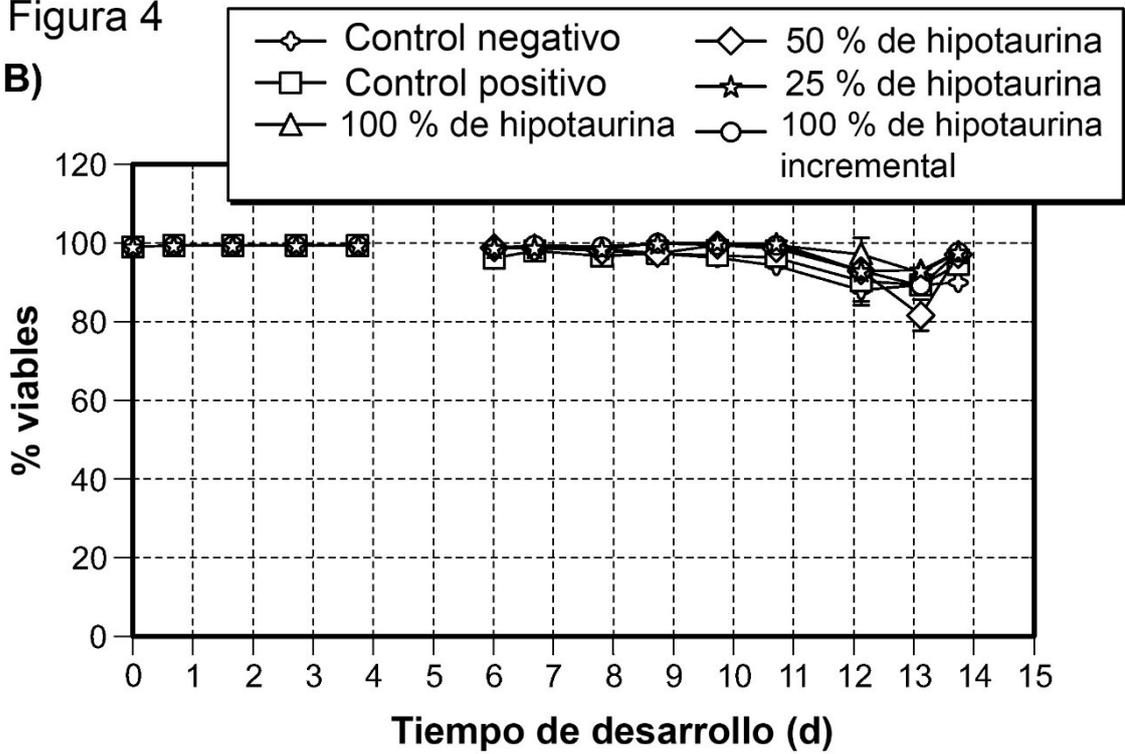


Figura 4

B)



C)

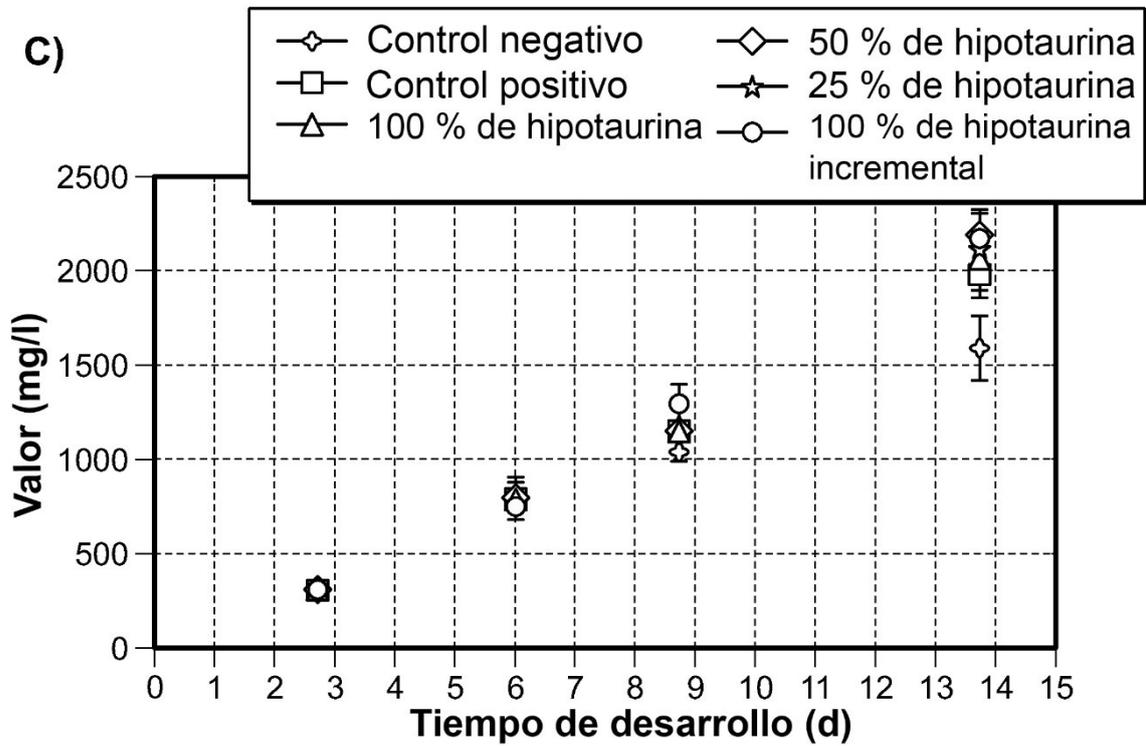


Figura 5

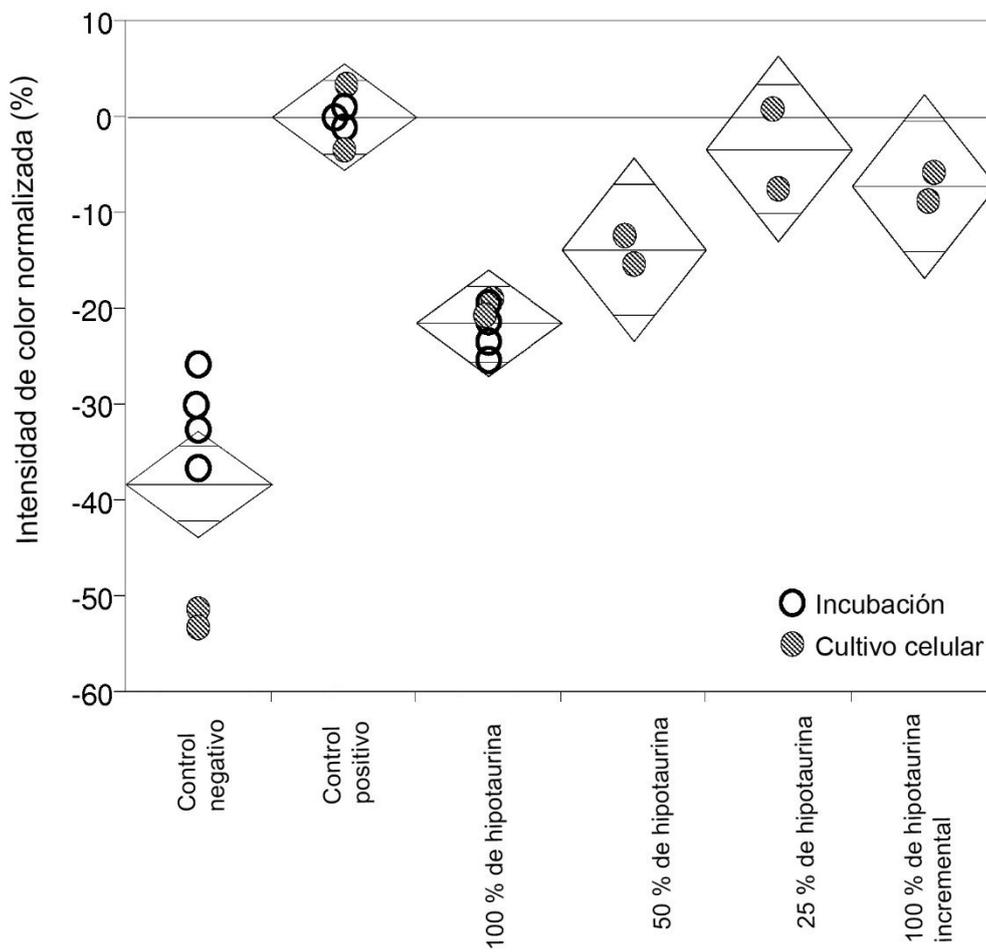


Figura 6

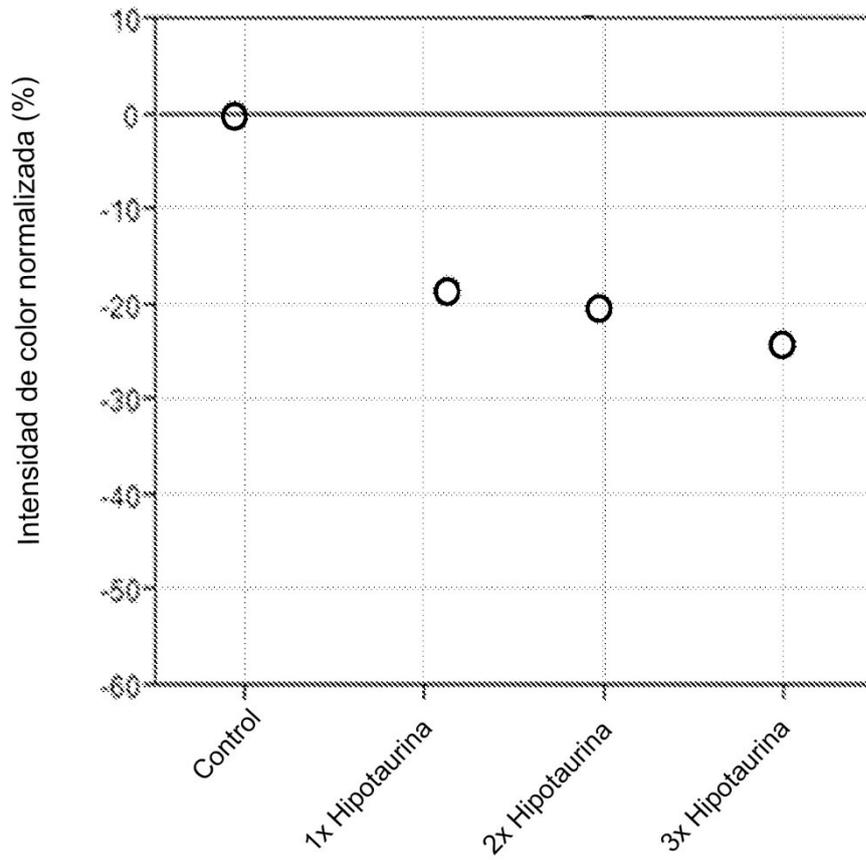


Figura 7

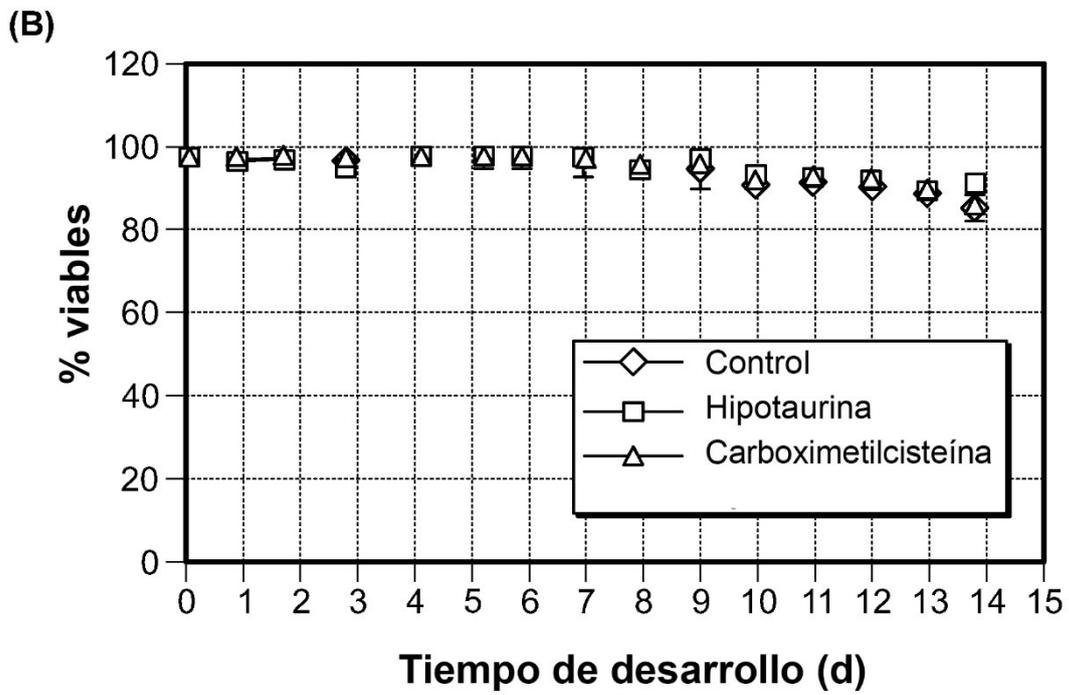
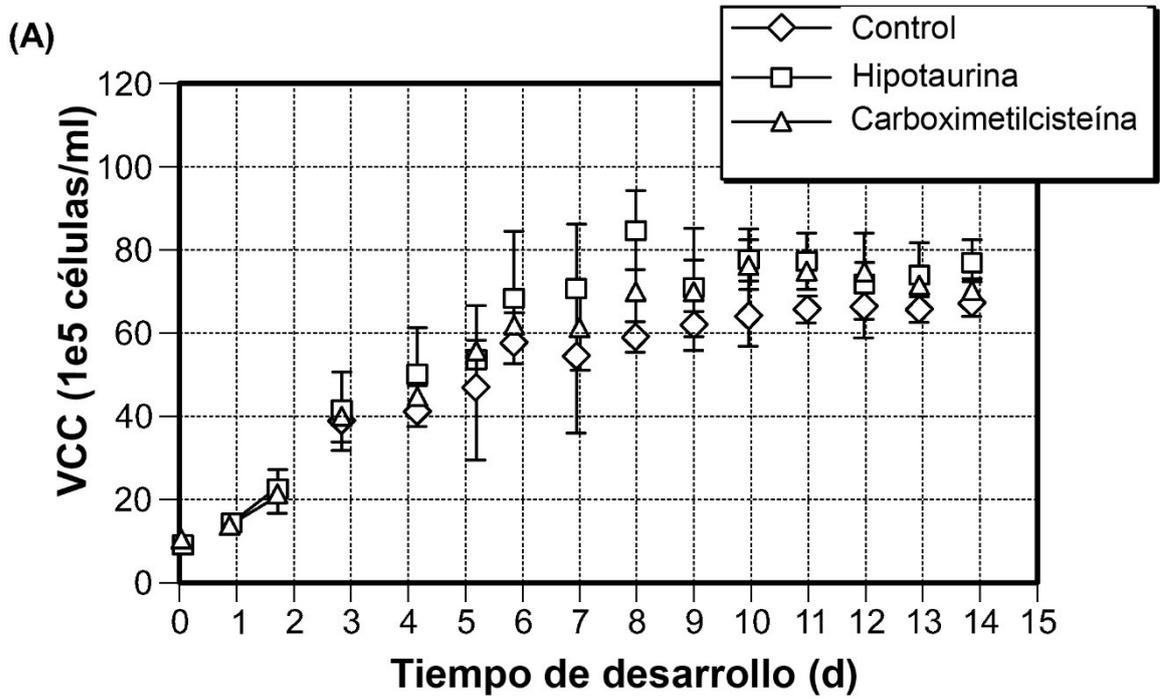


Figura 8

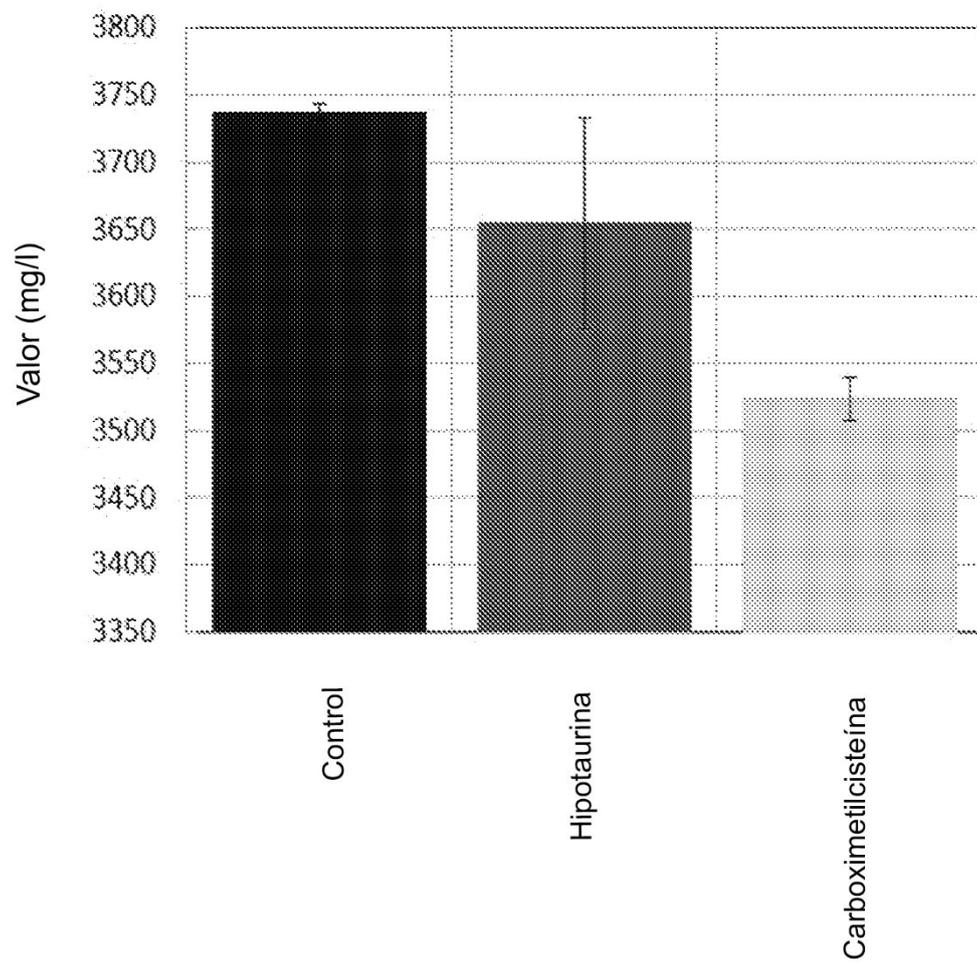
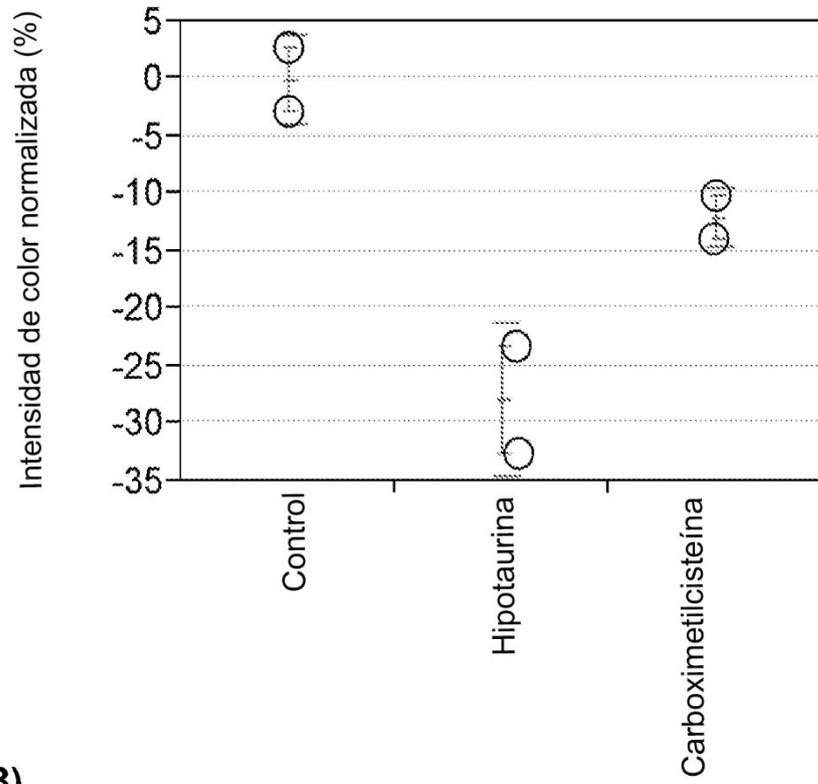


Figura 9

A)



B)

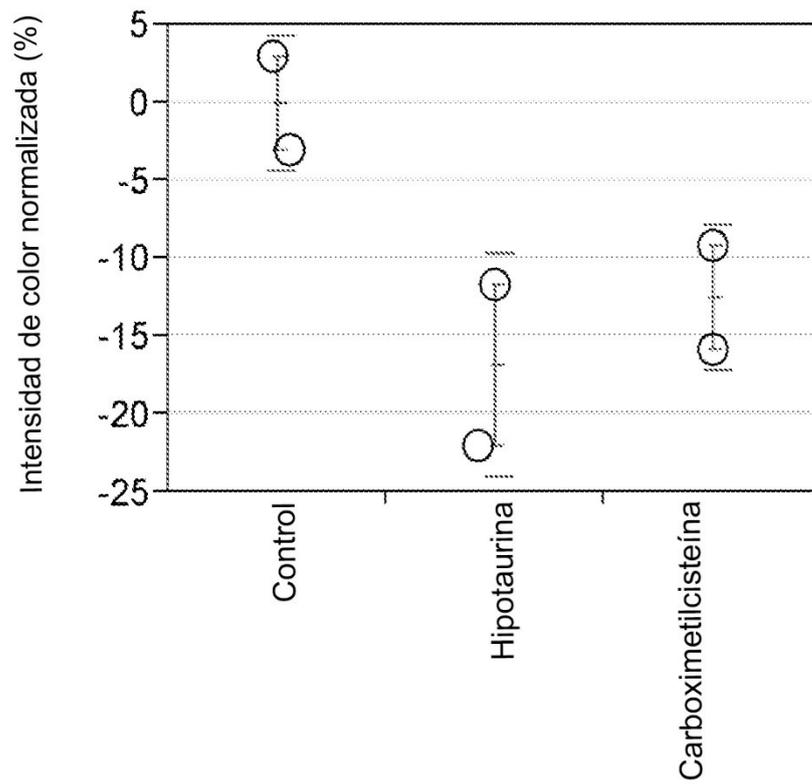


Figura 10

