

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 868**

51 Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2017 PCT/EP2017/059691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17186654**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2017 E 17718556 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 3448871**

54 Título: **Método para reducir el nivel de trisulfuro en proteínas**

30 Prioridad:

28.04.2016 EP 16167461

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

06.05.2024

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

ZIMMER, ALINE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 967 868 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

Método para reducir el nivel de trisulfuro en proteínas

La presente invención se refiere al uso de sulfocisteína y derivados de la misma como aditivos de cultivo celular para reducir los niveles de trisulfuro en proteínas similares a las IgG producidas en cultivo celular.

5 Las proteínas recombinantes, y en particular, los anticuerpos monoclonales (mAb), se han convertido en una importante clase de compuestos terapéuticos empleados para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades.

10 La producción eficiente y económica a gran escala de dichas biomoléculas, por ejemplo, proteínas terapéuticas, incluyendo los anticuerpos, es una consideración cada vez más importante para las industrias biotecnológica y farmacéutica. Típicamente, las proteínas se producen utilizando métodos de cultivo celular, por ejemplo, utilizando líneas celulares de mamíferos o bacterias modificadas por ingeniería recombinante para producir la proteína de interés.

15 Sin embargo, estas proteínas producidas de manera recombinante muestran una heterogeneidad considerable. Esta heterogeneidad puede ser resultado de modificaciones inducidas químicamente, tales como oxidación, desamidación y glicosilación, así como de modificaciones de postraduccion, tales como maduración proteolítica, plegamiento de proteínas, glicosilación, fosforilación y formación de enlaces disulfuro. La heterogeneidad molecular no es deseable, sobre todo si las proteínas terapéuticas están pensadas para su uso en humanos y tienen que ser aprobadas por organismos reguladores, tales como la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés).

Una heterogeneidad molecular que ha cobrado especial interés es la formación de enlaces trisulfuro.

20 Los anticuerpos (o inmunoglobulinas) están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas: dos polipéptidos de cadena ligera (LC) y dos polipéptidos de cadena pesada (HC). Las cuatro cadenas típicamente se unen en una configuración en "Y" mediante enlaces disulfuro que se forman entre residuos de cisteína presentes en las cadenas pesada y ligera. Estos enlaces disulfuro rigen la estructura global del tetrámero nativo de HC2LC2. Típicamente, los anticuerpos contienen cuatro enlaces disulfuro intercadena, incluyendo dos disulfuros de región bisagra que enlazan las cadenas H, y un enlace disulfuro entre cada cadena pesada H y L. Además, doce enlaces disulfuro intracadena pueden implicar a cada residuo de cisteína restante presente en la molécula. La formación incompleta de enlaces disulfuro, o la rotura de enlaces por oxidación o beta-eliminación seguida por mezclado de disulfuros, todas son fuentes potenciales de heterogeneidad de anticuerpos. Además, recientemente se ha informado un tipo adicional de modificación, a saber, la formación de enlaces trisulfuro (-CH₂-S-S-S-CH₂-). Para más información sobre la formación de enlaces trisulfuro, véase Pristatsky et al., Anal. Chem. 81: 6148 (2009).

30 Rashmi Kshirsagar et al., *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 109, No. 10, octubre de 2012, páginas 2523-2532 sugieren modificar y especialmente reducir el contenido de cisteína en medios de cultivo celular ya que ven una relación entre el contenido de cisteína y la formación de enlaces trisulfuro.

El documento WO 2011 041721 divulga un método para convertir enlaces trisulfuro en enlaces disulfuro en proteínas al permitir que las proteínas en una solución entren en contacto y se asocien con un soporte sólido y luego exponer dichas proteínas a una solución que comprende un agente reductor.

35 El documento WO2012158551 divulga un método para reducir la formación de enlaces trisulfuro en proteínas durante la producción a gran escala que comprende el cultivo de células que expresan esas proteínas en presencia de una cantidad eficaz de un inhibidor de la degradación de cisteína, por ejemplo, glutatión, piruvato, etc.

Sería favorable encontrar otras formas menos complicadas y/o más eficaces de reducir el nivel de trisulfuro en las proteínas.

40 Se ha descubierto que si la cisteína del medio de cultivo celular se sustituye por S-sulfocisteína y/o sales de la misma, la cantidad de enlaces trisulfuro en las proteínas producidas en dicho medio de cultivo celular disminuye en comparación con el mismo medio de cultivo celular que comprende cisteína.

45 La presente invención se dirige por consiguiente a un método para reducir la formación de enlaces trisulfuro en proteínas que comprende cultivar células que expresan esas proteínas por lo que se agrega un medio de alimentación al cultivo celular una o más veces durante el cultivo celular que no contiene ninguna cantidad significativa de cisteína o cistina sino que comprende S-sulfocisteína y/o sales de la misma, por lo que la formación de enlaces trisulfuro en dichas proteínas se reduce en relación con las células cultivadas en un medio de cultivo celular donde la cisteína y/o cistina del medio de alimentación no se ha sustituido parcial o de preferencia totalmente por S-sulfocisteína y/o sales de la misma, en donde dicho medio de alimentación que no contiene ninguna cantidad significativa de cisteína y/o cistina sino S-sulfocisteína y/o sus sales como sustitución es cualquier medio que contenga cisteína y/o cistina en una cantidad menor que 5 % (p/p) de la cantidad de S-sulfocisteína y/o sus sales.

En una realización preferida, la S-sulfocisteína y/o sales de la misma es sal de sodio de S-sulfocisteína.

En una realización preferida, el pH del recurso de alimentación que contiene S-sulfocisteína y/o sus sales se encuentra entre 6,8 y 7,5.

5 En otra realización preferida, la S-sulfocisteína y/o una sal de S-sulfocisteína se agregan en una cantidad tal que su concentración en el cultivo celular se encuentra entre 0,4 y 50 mM.

En una realización, las células se cultivan en un medio de cultivo celular que comprende al menos uno o más componentes sacáridos, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores vitamínicos, una o más sales, uno o más componentes reguladores, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

10 En una realización, la formación de enlaces trisulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada en dichas proteínas se reduce en relación con las células cultivadas en un medio de cultivo celular donde la cisteína y/o cistina del medio de alimentación no ha sido sustituida por S-sulfocisteína y/o sales de la misma.

En una realización, el método de la invención se realiza al

- Llenar en un biorreactor células y un medio líquido de cultivo celular

- Incubar las células en el biorreactor

15 - Continuamente durante todo el tiempo de incubación de las células en el biorreactor o una o varias veces dentro de dicho tiempo de incubación, agregar un medio de cultivo celular, que en este caso es un medio de alimentación, al biorreactor

por lo que el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o sales de la misma y contiene cisteína y/o cistina en una cantidad menor que 5 % (p/p) de la cantidad de S-sulfocisteína y/o sus sales.

20 Desde luego, también es posible agregar otros medios de alimentación que no comprendan S-sulfocisteína y/o sales de la misma. De preferencia, no se agregan medios de alimentación que contengan cisteína y/o cistina.

De preferencia, el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o una sal de S-sulfocisteína en una concentración entre 1 y 100 mmol/l, de preferencia entre 5 y 20 mmol/l.

25 De preferencia, durante todo el tiempo de incubación de las células en el biorreactor no se agrega ningún medio de alimentación que contenga cisteína y/o cistina.

La figura 1 muestra la estrategia utilizada para supervisar los niveles de trisulfuro en IgG. Pueden encontrarse más detalles en los ejemplos.

Las figuras 2-5 muestran la cuantificación relativa de los péptidos con enlace trisulfuro en la digestión combinada Lys-C / trípica en el día 13 y el día 18 del proceso de FB. Pueden encontrarse más detalles en los ejemplos.

30 La figura 6 muestra la superposición de cromatogramas de iones extraídos que muestran la relación entre el enlace de LC-HC con un puente disulfuro y el enlace de LC-HC con un puente trisulfuro. Pueden encontrarse más detalles en los ejemplos.

35 Los "enlaces trisulfuro" se generan mediante la inserción de un átomo de azufre adicional en un enlace disulfuro, dando lugar así a la unión covalente de tres átomos de azufre consecutivos. Los trisulfuros son una modificación postraduccional. Los enlaces trisulfuro pueden formarse entre los residuos de cisteína de las proteínas y pueden formarse intramolecularmente (es decir, entre dos cisteínas en la misma proteína) o intermolecularmente (es decir, entre dos cisteínas en proteínas separadas). Los trisulfuros se detectaron, por ejemplo, en los enlaces intercadena, predominantemente en los enlaces ligeros-pesados.

40 La presencia de enlaces trisulfuro puede detectarse utilizando, por ejemplo, el mapeo peptídico y puede detectarse basándose en un aumento de la masa de la proteína intacta debido a un átomo de azufre adicional (32Da). De este modo, los enlaces trisulfuro pueden detectarse utilizando espectrometría de masas, o mediante cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas (mapeo peptídico utilizando un sistema LC-MS). La figura 1 muestra un esquema general de cómo puede realizarse dicho análisis. Pueden encontrarse más detalles en los ejemplos.

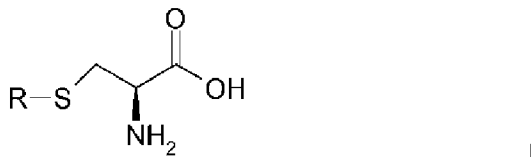
45 Las "proteínas" son macromoléculas que consisten en una o varias cadenas de residuos de aminoácidos. Los oligopéptidos y de preferencia los polipéptidos se incluyen dentro de la definición de proteína. Las proteínas desempeñan

una amplia gama de funciones dentro de los organismos vivos, que incluyen catalizar reacciones metabólicas, replicación del ADN, responder a estímulos y transportar moléculas de una ubicación a otra. Las proteínas se diferencian entre sí principalmente por su secuencia de aminoácidos. La mayoría de las proteínas se pliegan en estructuras tridimensionales únicas. Las proteínas pueden ser, por ejemplo, proteínas de origen natural o, de preferencia, proteínas producidas de manera recombinante. Ejemplos de proteínas son enzimas o, de preferencia, anticuerpos. También se incluyen como proteínas de acuerdo con la presente invención los fragmentos, derivados, análogos o variantes de las proteínas anteriores, y cualquier combinación de los mismos.

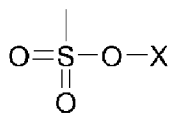
El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Típicamente, los anticuerpos tendrán una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consisten en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, dichas cadenas son estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercadena. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando retengan, o se modifiquen para comprender, un dominio de unión específico de ligando. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que una cadena de anticuerpo o anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos se pueden obtener mediante el tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos se pueden expresar solos o como parte de una proteína más grande llamada proteína de fusión. Los fragmentos de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv. Las proteínas de fusión de ejemplo incluyen proteínas de fusión Fc. De acuerdo con la presente invención, las proteínas de fusión también se abarcan por el término "anticuerpo".

La S-sulfocisteína, también llamada ácido (S)-2-amino-3-sulfosulfanilpropanoico, es un producto obtenido, por ejemplo, por la condensación del ácido sulfúrico y cisteína. Las sales adecuadas son sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de litio, sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio o sales de magnesio o mezclas de las mismas. Se prefieren las sales de sodio, las sales de potasio, la sal de calcio y la sal de magnesio, siendo las más preferidas las sales de sodio, especialmente la sal de sodio.

La S-sulfocisteína y sus sales también pueden mostrarse mediante la siguiente fórmula I:



con R que es



y X que es H, Li, Na, K, ½ Ca, ½ Mg, de preferencia H, Na, K. También puede utilizarse el término ácido propanoico en lugar del término ácido propiónico.

La síntesis del ácido 2-amino-3-sulfosulfanil-propiónico, también llamado ácido (S)-2-amino-3-sulfosulfanil-propanoico, S-sulfo-cisteína o cisteína-S-sulfato, y sus sales se da a conocer, por ejemplo, en I.H. Segel and M.J. Johnson, *Analytical Biochemistry* 5 (1963), 330-337 y J. S. Church, D.J. Evans, *Spectrochimica Acta Part A* 69 (2008) 256-262. La S-sulfocisteína está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich, Estados Unidos. La sal de sodio también está disponible comercialmente en Bachem, Suiza.

Un cultivo celular es cualquier preparación en la que se cultivan células. Un cultivo celular se utiliza, por ejemplo, para producir moléculas diana, similares a productos farmacéuticos, especialmente proteínas recombinantes similares a anticuerpos.

Un medio de cultivo celular es cualquier mezcla de componentes que mantiene y/o favorece el crecimiento *in vitro* de las células. Puede ser un medio complejo o un medio químicamente definido. El medio de cultivo celular puede comprender todos los componentes necesarios para mantener y/o apoyar el crecimiento *in vitro* de las células o sólo algunos componentes, de modo que se agreguen otros componentes por separado. Ejemplos de medios de cultivo celular son los medios completos que comprenden todos los componentes necesarios para mantener y/o apoyar el crecimiento *in vitro*

de las células, así como los suplementos de medios o recursos de alimentación. Un medio completo, también llamado medio base, típicamente tiene un pH entre 6,8 y 7,8. Un medio de alimentación de preferencia tiene un pH por debajo de 8,5. Los medios de cultivo celular que se utilizan de acuerdo con la presente invención son de preferencia medios de cultivo celular químicamente definidos.

5 Típicamente, los medios de cultivo celular de acuerdo con la invención se utilizan para mantener y/o apoyar el crecimiento de células en un biorreactor y para apoyar la producción de IgG de dichas células.

10 Algunos medios de cultivo celular se ofrecen como líquidos acuosos estériles. La desventaja de los medios líquidos de cultivo celular es su reducida vida útil y las dificultades para su envío y almacenamiento. Como consecuencia, muchos medios de cultivo celular se ofrecen actualmente como mezclas de polvo seco finamente molido. Se fabrican con el fin de disolverse en agua y/o soluciones acuosas y en estado disuelto están diseñados, a menudo con otros suplementos, para suministrar a las células una base nutritiva sustancial para el crecimiento y/o producción de biofármacos a partir de dichas células.

15 La mayoría de las plataformas de producción biofarmacéutica se basan en protocolos de cultivo celular por lotes alimentados. El objetivo típicamente es desarrollar procesos de cultivo celular de alta titulación para satisfacer la creciente demanda del mercado y reducir los costes de fabricación. Además de utilizar líneas celulares recombinantes de alto rendimiento, es necesario mejorar los medios de cultivo celular y los parámetros de procesos para alcanzar el máximo potencial de producción.

20 En un proceso por lotes alimentados, un medio base apoya el crecimiento y producción iniciales, y un medio de alimentación evita la merma de nutrientes y mantiene la fase de producción. Los medios se eligen para adaptarse a las distintas necesidades metabólicas durante las diferentes fases de producción. Los ajustes de parámetros de procesos - incluyendo la estrategia de alimentación y los parámetros de control - definen los entornos químicos y físicos adecuados para el crecimiento celular y la producción de proteínas.

25 Un recurso de alimentación o medio de alimentación es un medio de cultivo celular que no es el medio basal que apoya el crecimiento y producción iniciales en un cultivo celular, sino el medio que se agrega en una fase posterior para evitar la merma de nutrientes y sostiene la fase de producción. Un medio de alimentación puede tener concentraciones más elevadas de algunos componentes en comparación con un medio de cultivo basal. Por ejemplo, algunos componentes, tales como, por ejemplo, nutrientes que incluyen aminoácidos o carbohidratos, pueden estar presentes en el medio de alimentación en aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, o incluso en aproximadamente 1000X de las concentraciones en un medio basal.

30 De acuerdo con la presente invención, un medio de alimentación que no contiene cantidades significativas de cisteína y/o cistina, sino S-sulfocisteína y/o sus sales como sustitución, es cualquier medio que contenga cisteína y/o cistina en una cantidad menor que 5 % (p/p), de preferencia menor que 1 % (p/p) de la cantidad de S-sulfocisteína y/o sus sales, siendo lo más preferido que no contenga cisteína y/o cistina, sino que comprenda únicamente S-sulfocisteína y/o sus sales, así como otros posibles componentes de alimentación distintos de cisteína y/o cistina.

35 Un medio de cultivo de células de mamífero es una mezcla de componentes que mantienen y/o apoyan el crecimiento *in vitro* de células de mamífero. Ejemplos de células de mamífero son células humanas o animales, de preferencia células CHO, células COS, células I VERO, células BHK, células AK-1, células SP2/0, células L5.1, células de hibridoma o células humanas.

40 Los medios de cultivo celular químicamente definidos son medios de cultivo celular que no contienen sustancias químicamente indefinidas. Esto significa que se conoce la composición química de todos los productos químicos utilizados en los medios. Los medios químicamente definidos no comprenden ninguna levadura, tejido animal o vegetal; no comprenden células alimentadoras, suero, extractos, hidrolisados o concentrados u otros componentes químicamente mal definidos. Los componentes químicos no definidos o mal definidos son aquellos cuya composición química y estructura no se conocen, están presentes en composición variable o sólo podrían definirse con un enorme esfuerzo experimental - comparable a la evaluación de la composición química y la estructura de una proteína similar a albúmina o caseína.

45 Un medio de cultivo celular en polvo o un medio en polvo seco es un medio de cultivo celular típicamente resultante de un proceso de molienda o de un proceso de liofilización. Esto significa que el medio de cultivo celular en polvo es un medio granular y en partículas - no un medio líquido. El término "polvo seco" puede utilizarse indistintamente con el término "polvo"; sin embargo, "polvo seco", como se utiliza en la presente, se refiere simplemente al aspecto bruto del material granulado y no pretende significar que el material esté completamente libre de disolvente complejo o aglomerado, a menos que se indique lo contrario. Un medio de cultivo celular en polvo también puede ser un medio de cultivo celular granulado, por ejemplo, granulado en seco mediante compactación con rodillo.

Los medios de cultivo celular en polvo se producen de preferencia al mezclar todos los componentes y moliéndolos. La

mezcla de los componentes es conocida por una persona experta en la técnica de producir medios de cultivo celular en polvo seco mediante molienda. De preferencia, todos los componentes se mezclan minuciosamente para que todas las partes de la mezcla tengan casi la misma composición. Cuanto mayor sea la uniformidad de la composición, mejor será la calidad del medio resultante con respecto al crecimiento celular homogéneo.

- 5 La molienda puede realizarse con cualquier tipo de molino adecuado para producir medios de cultivo celular en polvo. Ejemplos típicos son los molinos de bolas, los molinos de púas, los molinos fitz o los molinos de chorro. Se prefiere un molino de púas, un molino fitz o un molino de chorro, se prefiere más un molino de púas.

Un experto en la técnica sabe cómo hacer funcionar estos molinos.

- 10 Para el uso de los medios molidos en polvo se agrega al medio un disolvente, de preferencia agua (más particularmente agua destilada y/o desionizada o agua purificada o agua para inyección) o un regulador acuoso y se mezclan los componentes hasta que el medio se disuelva totalmente en el disolvente.

El disolvente también puede comprender solución salina, iones ácidos o bases solubles que proporcionen un intervalo de pH adecuado (normalmente en el intervalo entre pH 1,0 y pH 10,0), estabilizadores, tensioactivos, conservantes y alcoholes u otros disolventes orgánicos polares.

- 15 También es posible agregar otras sustancias similares a sustancias reguladoras para ajustar el pH, suero fetal de ternera, azúcares, etc., a la mezcla del medio de cultivo celular y el disolvente. A continuación, el medio de cultivo celular líquido resultante se pone en contacto con las células que se desea cultivar o mantener.

- 20 Las células que han de tratarse con el método de acuerdo con la presente invención pueden ser células normales, células inmortalizadas, células enfermas, células transformadas, células mutantes, células somáticas, células germinales, células madre, células precursoras o células embrionarias, cualquiera de las cuales pueden ser líneas celulares establecidas o transformadas u obtenidas de fuentes naturales. De preferencia, las células son células de mamífero, de mayor preferencia células BHK, VERO, HEK o CHO, siendo las más preferidas las células CHO-S, CHO dhfr- (DG44 y Duxb11), CHO-M y CHOK1.

- 25 Los medios de cultivo celular, especialmente los medios completos, comprenden típicamente al menos uno o más componentes sacáridos, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores vitamínicos, una o más sales, uno o más componentes reguladores, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

- 30 Los medios también pueden comprender piruvato sódico, insulina, proteínas vegetales, ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos y/o ácido plurónico y/o componentes activos de superficie similares a tensioactivos no iónicos preparados químicamente. Un ejemplo de tensioactivo no iónico adecuado son los tensioactivos copolímeros en bloque difuncionales que terminan en grupos hidroxilo primarios también denominados poloxámeros, por ejemplo, disponibles bajo el nombre comercial pluronic® en BASF, Alemania.

Los componentes sacáridos son todos monosacáridos o disacáridos, similares a glucosa, galactosa, ribosa o fructosa (ejemplos de monosacáridos) o sacarosa, lactosa o maltosa (ejemplos de disacáridos).

- 35 Ejemplos de aminoácidos de acuerdo con la invención son tirosina, aminoácidos proteínogénicos, especialmente aminoácidos esenciales, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, así como los aminoácidos no proteínogénicos similares a D-aminoácidos.

Tirosina significa L- o D-tirosina, de preferencia L-tirosina.

Por cisteína se entiende L- o D-cisteína, de preferencia L-cisteína.

- 40 Ejemplos de vitaminas son vitamina A (retinol, retinal, varios retinoides y cuatro carotenoides), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina, niacinamida), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina, piridoxamina, piridoxal), vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (ácido fólico, ácido folínico), vitamina B12 (cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D (ergocalciferol, colecalciferol), vitamina E (tocoferoles, tocotrienoles) y vitamina K (filoquinona, menaquinonas). También se incluyen precursores vitamínicos.

- 45 Ejemplos de sales son componentes que comprenden iones inorgánicos tales como bicarbonato, calcio, cloruro, magnesio, fosfato, potasio y sodio u oligoelementos tales como Co, Cu, F, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Ni, Bi, V y Zn. Ejemplos son sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), sulfato de hierro (II), fosfato de sodio monobásico anhidro (NaH_2PO_4), sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato de zinc heptahidratado.

Ejemplos de reguladores son CO_2/HCO_3 (carbonato), fosfato, HEPES, PIPES, ACES, BES, TES, MOPS y TRIS.

Ejemplos de cofactores son derivados de tiamina, biotina, vitamina C, NAD/NADP, cobalamina, mononucleótido de flavina y derivados, glutatión, nucleótido hemo fosfatos y derivados.

5 Los componentes de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, son nucleobases, similares a citosina, guanina, adenina, timina o uracilo, nucleósidos similares a citidina, uridina, adenosina, guanosina y timidina, y nucleótidos similares a monofosfato de adenosina o difosfato de adenosina o trifosfato de adenosina.

Los medios de alimentación pueden tener una composición diferente en comparación con los medios completos. Típicamente comprenden aminoácidos, oligoelementos y vitaminas. También pueden incluir componentes sacáridos, pero a veces, por razones de producción, los componentes sacáridos se agregan en un recurso de alimentación separado.

10 Un medio de alimentación adecuado que ha de utilizarse de acuerdo con el método de la presente invención podría, por ejemplo, comprender además de S-sulfocisteína uno o más de los siguientes compuestos, pero no cisteína o cistina:

L-ASPARAGINA MONOHIDRATO

L-ISOLEUCINA

L-FENILALANINA

15 L-GLUTAMATO SÓDICO MONOHIDRATADO

L-LEUCINA

L-TREONINA

MONOCLORHIDRATO DE L-LISINA

L-PROLINA

20 L-SERINA

MONOCLORHIDRATO DE L-ARGININA

L-HISTIDINA MONOCLORHIDRATO MONOHIDRATO

L-METIONINA

L-VALINA

25 MONO-SODIO-L-ASPARTATO-MONOHIDRATO

L-TRIPTÓFANO

CLORURO DE COLINA

MIO-INOSITOL

NICOTINAMIDA

30 D(+) PANTOTENATO DE CALCIO

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

CLORHIDRATO DE CLORURO DE TIAMINA

VITAMINA B12 (CIANOCOBALAMINA) MICRONIZADA

BIOTINA

35 ÁCIDO FÓLICO

RIBOFLAVINA

SULFATO DE MAGNESIO ANHIDRO

SULFATO DE COBRE (II) PENTAHIDRATADO

SULFATO DE ZINC HEPTAHIDRATADO

40 DIHIDROCLORURO DE 1,4-DIAMINO BUTANO

HEPTAMOLIBDATO DE AMONIO TETRAHIDRATADO

HIDRATO DE SULFATO DE CADMIO

CLORURO DE MANGANESO (II) TETRAHIDRATADO

CLORURO DE NÍQUEL (II) HEXAHIDRATADO

METISILICATO DE SODIO

METAVANADATO DE SODIO

5 CLORURO DE ESTAÑO (II) DIHIDRATO

SELENITO DE SODIO (APROXIMADAMENTE 45 % DE SE)

DIHIDRÓGENO FOSFATO SÓDICO MONOHIDRATADO

CITRATO AMÓNICO DE HIERRO (III) (APROXIMADAMENTE 18 % DE FE)

10 La esencia de la presente invención es disminuir la cantidad de enlaces trisulfuro que se encuentran en la proteína o, de preferencia, IgG que se produce en el cultivo celular mediante la sustitución de cisteína y/o cistina por S-sulfocisteína y/o sus sales.

15 Se ha descubierto que la formación de enlaces trisulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada en dichas proteínas, especialmente los anticuerpos, se reduce eficazmente, normalmente más del 75 %, en comparación con el cultivo celular sin sustituir cisteína y/o cistina en el recurso de alimentación por S-sulfocisteína y/o sus sales.

Sorprendentemente, se encontró la reducción de otra formación de trisulfuro. Se encontró la formación de trisulfuro en dichas proteínas, especialmente anticuerpos, en el enlace entre cisteína 259 y cisteína 319 en la cadena pesada y también pudo reducirse con el método de la invención.

20 Las células que han de tratarse con un medio de alimentación que comprende S-sulfocisteína y/o sus sales en lugar de cisteína y/o cistina de acuerdo con la invención son típicamente células que se cultivan en un biorreactor con fines de producción biofarmacéutica.

La S-sulfocisteína y/o sus sales pueden agregarse a las células en cualquier fase del cultivo celular, de forma comparable con la adición de cisteína y/o cistina.

25 Puede agregarse al iniciar el cultivo celular. En este caso, la S-sulfocisteína y/o sus sales se mezclan y muelen de preferencia con los demás ingredientes del medio base que se utiliza para iniciar el cultivo celular. Esta mezcla de polvo seco que comprende S-sulfocisteína y/o sus sales se disuelve a continuación en un disolvente adecuado al mezclar el polvo y el disolvente de forma tal que el polvo se disuelva y produzca un medio de cultivo celular líquido con una concentración deseada y homogénea de los componentes de medios.

30 La S-sulfocisteína y/o sus sales también pueden agregarse una o más veces durante el cultivo de las células. Un cultivo celular típicamente se realiza de 1 a 3 semanas. Durante este tiempo se agrega un medio de alimentación de forma continua o una o más veces. La S-sulfocisteína y/o sus sales pueden agregarse al cultivo en un medio de alimentación junto con otros ingredientes de medio de alimentación o pueden agregarse en un recurso de alimentación separado que sólo contenga S-sulfocisteína y/o sus sales. También, el recurso de alimentación suele ser líquido, de modo que todos sus componentes se disuelven en un disolvente adecuado antes de agregarlo al cultivo celular.

35 En una realización preferida, el cultivo celular se inicia con un medio base que contiene cisteína y/o cistina, pero no S-sulfocisteína y/o sus sales, y la S-sulfocisteína y/o sus sales se agregan como recurso de alimentación. Se agrega de preferencia al menos 4 veces durante el cultivo celular, de preferencia entre 4 y 6 veces. En una realización, la S-sulfocisteína y/o sus sales se agregan entre cada segundo día y cada cuarto día.

40 El pH del recurso de alimentación que contiene S-sulfocisteína y/o sus sales suele estar entre 5 y 7,5, de preferencia entre 6,8 y 7,5, y de mayor preferencia entre 6,8 y 7,1.

Típicamente, un cultivo celular se realiza al

a) proporcionar un biorreactor

b) mezclar las células que se van a cultivar con un medio de cultivo celular líquido en el biorreactor

45 c) incubar la mezcla del paso b) durante un tiempo determinado, por lo que un medio de alimentación que comprende S-sulfocisteína pero no cantidades significativas de, de preferencia ninguna, cistina o cisteína, se agrega al menos una vez durante ese tiempo.

5 Un biorreactor es cualquier contenedor, bolsa, recipiente o tanque en el que pueden cultivarse células. Una persona con experiencia en la técnica sabe cómo realizar un cultivo celular. Esto se hace típicamente al incubar las células en el biorreactor bajo condiciones adecuadas similares a pH, osmolalidad, temperatura, agitación, aireación (oxígeno/CO₂), etc., y la adición opcional de medios de alimentación una o varias veces durante el cultivo celular. De preferencia, el cultivo celular se realiza como cultivo celular por lotes alimentados.

10 El cultivo por lotes alimentados es un proceso de cultivo celular donde uno o más nutrientes (sustratos) se alimentan (suministran) al biorreactor durante el cultivo de las células y en el que el producto o productos permanecen en el biorreactor hasta el final del ciclo. Una descripción alternativa del método es la de un cultivo en el que un medio base apoya el cultivo celular inicial y se agrega un medio de alimentación para evitar la merma de nutrientes. La ventaja del cultivo por lotes alimentados es que puede controlarse la concentración de sustrato alimentado en el líquido de cultivo a niveles arbitrariamente deseados.

En términos generales, el cultivo por lotes alimentados es superior al cultivo por lotes convencional cuando el control de las concentraciones de un nutriente (o nutrientes) afecta a la homogeneidad o al rendimiento del metabolito deseado, como en este caso la S-sulfocisteína y/o sus sales.

15 Por consiguiente, de preferencia, la presente invención se realiza al

- Llenar en un biorreactor células y un medio líquido de cultivo celular

- Incubar las células en el biorreactor

20 - Continuamente durante todo el tiempo de incubación de las células en el biorreactor o una o varias veces dentro de dicho tiempo de incubación, agregar un medio de cultivo celular, que en este caso es un medio de alimentación, al biorreactor

por lo que el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o sus sales, pero no cantidades significativas de cisteína y/o cistina, de preferencia ninguna, y de preferencia tiene un pH entre 6,8 y 7,5.

25 Se ha encontrado que la reducción de la cantidad de enlaces trisulfuro es especialmente eficaz si el cultivo celular comprende la menor cantidad posible de cisteína y/o cistina. Por consiguiente, si las células pueden cultivarse con S-sulfocisteína y/o sus sales únicamente, de preferencia, el cultivo celular no comprende ninguna cisteína y/o cistina. Para algunas células es necesario que el medio base contenga cisteína y/o cistina, ya que no muestran un rendimiento y/o crecimiento suficientes en medios que contienen S-sulfocisteína y/o sus sales, pero no contienen cisteína y/o cistina. En este caso, de preferencia, el medio base comprende cisteína y/o cistina y los medios de alimentación que se agregan durante el cultivo no comprenden ninguna cisteína y/o cistina adicional.

30 Es obvio para un experto en la técnica que pueden agregarse uno o varios tipos de medios de alimentación al cultivo celular. Si se utiliza una estrategia de alimentación única, sólo se agrega un tipo de medio de alimentación al cultivo celular, ya sea de forma continua, o una o varias veces durante el cultivo celular. De acuerdo con el método de la invención, este medio de alimentación único no contiene cantidades significativas de cisteína y/o cistina, sino S-sulfocisteína y/o sus sales como sustitución. Si se agregan varios medios de alimentación diferentes a un cultivo celular, de acuerdo con el método de la invención, de preferencia ninguno de estos medios de alimentación contiene cisteína y/o cistina. No es necesario que todos los medios de alimentación contengan S-sulfocisteína y/o sus sales. Por ejemplo, podría ser favorable agregar un recurso de alimentación que contenga vitaminas, oligoelementos y aminoácidos, así como S-sulfocisteína y/o sus sales, y un segundo recurso de alimentación en otros momentos, por lo que el segundo recurso de alimentación es, por ejemplo, un recurso de alimentación de carbohidratos que, de preferencia, no contenga S-sulfocisteína y/o sus sales.

35

40 En cualquier caso, al menos una vez durante el cultivo celular se agrega un recurso de alimentación que no contiene cantidades significativas o, de preferencia, no contiene cisteína y/o cistina, pero que comprende S-sulfocisteína y/o sus sales.

45 Se ha descubierto que con el método de la presente invención, la cantidad de trisulfuros puede reducirse eficazmente. De preferencia, puede reducirse la formación de trisulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada. Esta formación de trisulfuros puede reducirse en más de un 75 %, de preferencia en más de un 85 %, en comparación con los procesos de cultivo celular en los que la cistina y/o la cisteína del medio de alimentación no se sustituyen por S-sulfocisteína y/o sus sales.

50 Las proteínas que han sido tratadas de acuerdo con el método de la presente invención y para las que se ha reducido la formación de enlaces trisulfuro pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico, inmunoensayos y/o composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones, la proteína, por ejemplo el anticuerpo, tratada con el método de la presente invención tiene una mayor estabilidad de almacenamiento en comparación con un control no tratado. En otra realización, la proteína, por

ejemplo el anticuerpo, tratada con el método de la presente invención tiene una menor tendencia a agregarse en comparación con un control no tratado. En otras realizaciones, el tratamiento de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, con el método de la presente invención produce una disminución de la oxidación, por ejemplo, la oxidación de metionina, en comparación con un control no tratado.

5 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para reducir la oxidación de proteínas, por ejemplo, la oxidación de metionina, en una composición de proteínas, por ejemplo, anticuerpos, que comprende reducir el nivel de trisulfuros en la composición de proteínas. Otra realización proporciona un método para reducir la adición de proteínas en una composición de proteínas, por ejemplo, anticuerpos, que comprende la reducción del nivel de trisulfuros en la
10 composición de proteínas. Otra realización proporciona un método para aumentar la estabilidad proteica en una composición de proteínas, por ejemplo, anticuerpos, que comprende reducir el nivel de trisulfuros en la composición de dichas proteínas.

Otra realización proporciona un método para aumentar o mejorar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de proteínas y anticuerpos, mediante la conversión de enlaces trisulfuro en enlaces disulfuro en un anticuerpo al realizar los pasos de proceso descritos anteriormente.

15 La presente invención se ilustra adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin limitarse a los mismos.

La divulgación completa de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas anteriormente y a continuación, así como la solicitud de patente correspondiente EP 16167461.9 presentada el 28 de abril de 2016 se incorporan por la presente como referencia.

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos representan aplicaciones prácticas de la invención.

1. Protocolos

a. Proceso de lotes alimentados

25 Las células CHO recombinantes que expresan una IgG1 se cultivaron en un medio basal químicamente definido (Cellvento® CHO 220) que contenía 1,5 mM de cisteína. En los días 3, 5, 7, 10 y 14, se agregaron recursos de alimentación que contenían cisteína o S-sulfocisteína.

Para la condición de control, el recurso de alimentación principal incluía vitaminas, oligoelementos y aminoácidos, excepto cisteína debido a la baja estabilidad de este aminoácido. Se disolvieron 150 mM de cisteína en un recurso de alimentación separado a pH 11. El recurso de alimentación principal se agregó al 3 %, 6 %, 6 %, 6 % y 6 % (v/v), mientras que la
30 cisteína se agregó al 0,3 %, 0,6 %, 0,6 %, 0,6 % y 0,6 % los días 3, 5, 7, 10 y 14, respectivamente.

En el caso de la condición SSC, el recurso de alimentación principal incluía las mismas vitaminas, oligoelementos y aminoácidos y se complementó además con 15 mM de sal di-sódica de S-sulfocisteína. Se agregó al recurso de alimentación principal 3 %, 6 %, 6 %, 6 % y 6 % (v/v) los días 3, 5, 7, 10 y 14 respectivamente, lo que dio como resultado
35 la misma cantidad de fuente de cisteína en comparación con la condición de control. La glucosa se supervisó diariamente en ambas condiciones y se ajustó a 6 g/L utilizando una solución de 400 g/L.

El proceso se realizó en biorreactores de 1,2 L a 37 °C, pH 7,0, 50 % de oxígeno disuelto, agitación a 140 rpm.

Se tomaron muestras de los biorreactores para el análisis de trisulfuro el día 13 y el día 18. Tras la toma de muestras, el sobrenadante de cultivo celular se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, la concentración de IgG se cuantificó mediante un método turbidométrico automático (Cedex bioHT) y se congeló para su procesamiento adicional.

40 b. Purificación de IgG a partir del sobrenadante de cultivo celular

Las IgG se purificaron a partir de las muestras congeladas utilizando la unión a proteína A (método Phytips) y se eluyeron en 200 mM de NaH_2PO_4 ; 140 mM de NaCl y 96 mM de Tris HCl y se cuantificaron nuevamente.

c. Generación de péptidos a partir de IgG

45 En primer lugar, las cisteínas libres en las muestras se alquilaban mediante la adición de N-etilmaleimida (solución de 10 mM en 0,1 M de regulador de acetato de Na en pH 5,0) durante 30 minutos en la oscuridad.

Para la digestión con Lys-C, se agregaron 55 µL de regulador de digestión (8 M de urea, 0,1 M de Tris, pH 7) y 15 µL de enzima Lys-C (Promega, V1671) y las muestras se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las muestras se diluyeron a 1 M de urea mediante la adición de 468 µL de regulador de digestión y se digirieron mediante la adición de 12 µL de tripsina durante toda la noche a 37 °C. La concentración final de anticuerpos fue de 50 mg/L. Para el análisis de los enlaces disulfuro y trisulfuro, la muestra se trató con ácido fórmico al 10 % (4,4 µL) para detener la digestión y se analizó mediante LC-MS.

d. Método LC-MS/MS

La mezcla de péptidos obtenida se inyectó y separó mediante HPLC de fase inversa (RSLC3000 nano LC, Thermo Scientific Dionex, Idstein, Alemania). Para la preconcentración y separación de la muestra se utilizó una columna nano LC (Acquity UPLC M-Class HSS T3, 1,8 µm, 75 µm x 150 mm, Waters) con un cartucho (PM100, C18, 5 µm, 0,3x5 mm, Thermo Scientific Dionex, Idstein, Alemania). Se realizaron rondas en blanco y rondas de lavado de columna dentro de rondas de muestras consecutivas.

Se aplicó un gradiente lineal optimizado de 26 minutos con pendientes variables a 50 °C de la siguiente manera (minuto/% B): 0/2, 0,25/2, 8/16, 20/29, 26,25/45, 27,25/99, 30,25/199, 31,25/20, 32,25/20, 33,25/99, 34,25/99, 35,25/2, 38/2. La cantidad de inyección fue de 5-7 µL (~ 0,35 µg). La muestra se cargó a una tasa de flujo de 120 µL/min en el cartucho durante 0,25 minutos. Para la carga, se utilizó un eluyente compuesto por 97,95 % de agua, 2 % de acetonitrilo y 0,05 % de TFA. Posteriormente, se conmutó la válvula, la muestra se transfirió a la columna analítica y se separó utilizando una tasa de flujo de 0,6 µL/min. El eluato de HPLC se introdujo directamente en un espectrómetro de masas QExactive plus (Thermo scientific, Bremen, Alemania). El espectrómetro de masas funcionó en modo de iones positivos, el voltaje de pulverización fue de 1,9 kV, la temperatura capilar fue de 275 °C y el voltaje de RF de la Lente S fue de 55 V. Para el barrido de iones de producto MS/MS, el tipo de activación fue disociación inducida por colisión (CID), el estado de carga por defecto fue 2. El método QExactive de 4 barridos por evento aplicado consiste en un barrido de inspección MS completo a m/z 200-2000 y un poder de resolución (RP) de 70 000, seguido de tres ciclos de barridos MS/MS dependientes de datos en los tres iones más intensos. Se activó la función de exclusión dinámica y los parámetros fueron los siguientes: exclusión dinámica de 10 s, ventana de aislamiento de 2 m/z, resolución de 17 500, objetivo AGC de 3e6, tiempo máximo de inyección de 250 ms, energía de colisión normalizada de 25, relación de relleno insuficiente de 0,1 %, umbral de intensidad de 1,2e4. Los estados de carga no asignados y el estado de carga ≥8 se rechazaron para el disparo de MS/MS y se habilitó una lista de masas rechazadas que contenía iones de polisiloxano. La exclusión dinámica fue de 10 s. Se realizaron rondas de repeticiones con y sin exclusión del estado de carga +1. Para el procesamiento de datos se utilizó la búsqueda tolerante a errores Mascot 2.3 (Matrix Science London, Reino Unido) basada en una base de datos de proteínas propia que contenía las secuencias de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo analizado respectivamente. Los espectros de MS/MS se deconvolucionaron utilizando el procesador MS2 antes de la búsqueda en la base de datos y se adaptó la configuración de Mascot para permitir la identificación de péptidos pequeños: el péptido más corto probado en la búsqueda y evidenciado en el informe se fijó en 4 aminoácidos. Los parámetros de búsqueda de Mascot fueron: enzima fue tripsina, 2 escisiones fallidas permitidas, modificación fija de carbamidometilación para la concentración triptica, tolerancia peptídica:6 ppm, tolerancia de MS/MS 0,05 Da, carga peptídica +2, +3, +4, búsqueda tolerante a errores activada, puntuación iónica mínima 15.

2. Resultados

Las figuras 2-5 muestran los resultados de la cuantificación de la formación de trisulfuros entre la cadena ligera y la cadena pesada de la IgG (LC-HC) así como entre 2 residuos de cisteína de la HC (HC_Cys259-Cys319) los días 13 y 18 respectivamente.

El porcentaje relativo del péptido enlazado con trisulfuro se calculó al dividir el área del péptido enlazado con trisulfuro por la suma de las áreas del péptido enlazado con trisulfuro y con disulfuro.

Los resultados indican que la mayor cantidad de trisulfuro se encontró para los péptidos enlazados con LC-HC en las muestras de control producidas utilizando cisteína en el recurso de alimentación separado. La cantidad de trisulfuro disminuye en las muestras producidas utilizando recurso de alimentación SSC. La reducción media de trisulfuro es de 93,3 % en el día 13 y 92,4 % en el día 18 cuando se utiliza SSC en comparación con la condición de control. Tres órdenes de magnitud más bajas, se encontraron evidencias de formación de trisulfuros en el enlace entre cisteína 259 y cisteína 319 de la cadena pesada. Aunque la cantidad relativa es muy baja, los datos son muy coherentes y confirman la tendencia observada para la formación de trisulfuros entre el enlace de LC-HC. La cantidad de trisulfuro disminuye en las muestras producidas utilizando recurso de alimentación SSC. La reducción media de trisulfuro es de 46,7 % en el día 13 y 25,9 % en el día 18 cuando se utiliza SSC en comparación con la condición de control.

La figura 6 muestra la superposición de cromatogramas de iones extraídos que muestran la relación entre el enlace de LC-HC con un puente disulfuro y el enlace de LC-HC con un puente trisulfuro.

La figura 6 ilustra la disminución relativa de la formación de trisulfuros en el enlace de LC-HC en el FB utilizando SSC

ES 2 967 868 T3

(gris oscuro) con respecto al péptido enlazado con disulfuro cuando se compara con el enlace de LC-HC en el FB de control utilizando cisteína en el recurso de alimentación separado (gris claro).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir la formación de enlaces trisulfuro en proteínas que comprende cultivar células que expresan esas proteínas por lo que se agrega un medio de alimentación al cultivo celular una o más veces durante el cultivo celular que no contiene cantidades significativas de cisteína o cistina sino que comprende S-sulfocisteína y/o sales de la misma, por lo que la formación de enlaces trisulfuro en dichas proteínas se reduce en relación con las proteínas expresadas por las células cultivadas en un medio de cultivo celular donde la cisteína y/o cistina del medio de alimentación no se ha sustituido por S-sulfocisteína y/o sales de la misma, en donde dicho medio de alimentación que no contiene cantidades significativas de cisteína y/o cistina sino S-sulfocisteína y/o sus sales como sustitución es cualquier medio que contenga cisteína y/o cistina en una cantidad menor que 5 % (p/p) de la cantidad de S-sulfocisteína y/o sus sales.
- 10 2. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la S-sulfocisteína y/o sales de la misma es sal de sodio de S-sulfocisteína.
3. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la S-sulfocisteína y/o una sal de S-sulfocisteína se agregan en el medio de alimentación en una cantidad tal que su concentración en el cultivo celular se encuentra entre 0,4 y 50 mM.
- 15 4. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las células se cultivan en un medio de cultivo celular que comprende al menos uno o más componentes sacáridos, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores vitamínicos, una o más sales, uno o más componentes reguladores, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.
- 20 5. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el pH del recurso de alimentación que comprende S-sulfocisteína y/o sus sales se encuentra entre 6,8 y 7,5.
6. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o una sal de S-sulfocisteína, así como vitaminas, oligoelementos y aminoácidos.
7. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se reduce la formación de enlaces trisulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada en dichas proteínas.
- 25 8. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se reduce la formación de trisulfuro en el enlace entre cisteína 259 y cisteína 319 de la cadena pesada en dichas proteínas.
9. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el método se realiza al
 - Llenar en un biorreactor células y un medio líquido de cultivo celular
 - Incubar las células en el biorreactor
- 30 - Continuamente durante todo el tiempo de incubación de las células en el biorreactor o una o varias veces dentro de dicho tiempo de incubación agregar un medio de cultivo celular, el cual en este caso es un medio de alimentación, al biorreactor

por lo que el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o sales de la misma y ninguna cantidad significativa de cisteína y/o cistina.
- 35 10. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el medio de alimentación comprende S-sulfocisteína y/o una sal de S-sulfocisteína en una concentración entre 1 y 100 mmol/l.
11. Método de conformidad con una o más de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque durante todo el tiempo de incubación de las células en el biorreactor no se agrega ningún medio de alimentación que contenga cisteína y/o cistina.

Fig. 1

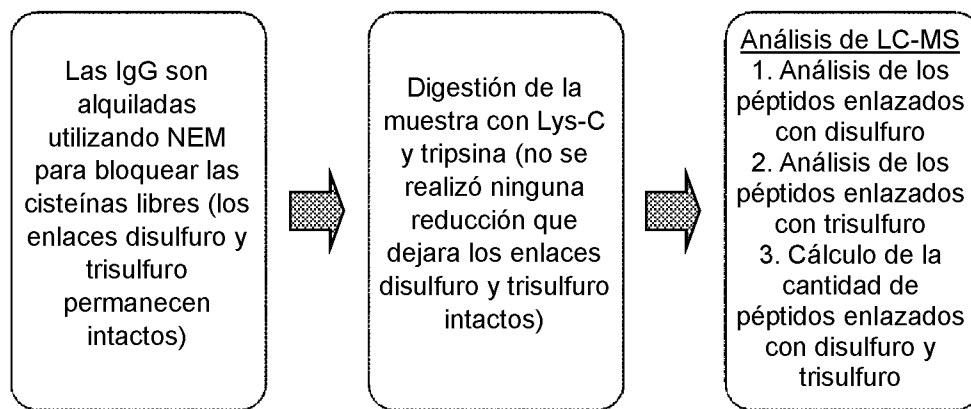


Fig. 2

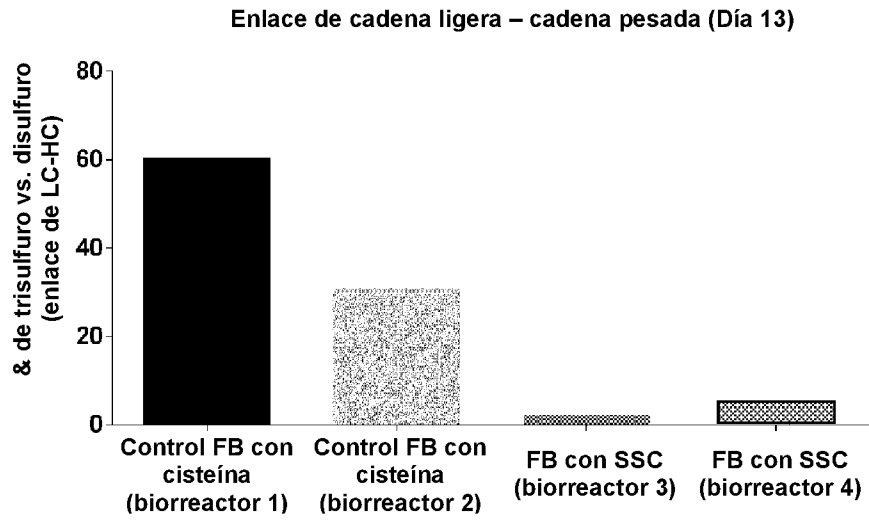


Fig. 3

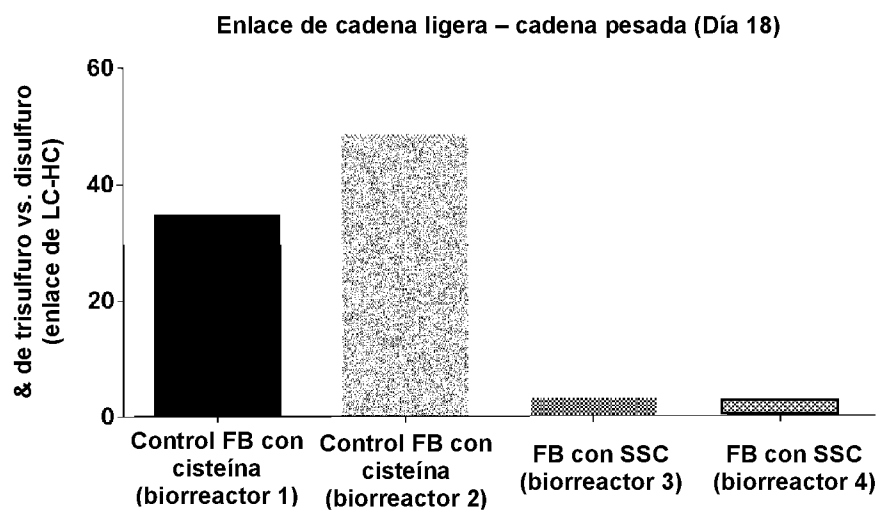


Fig. 4

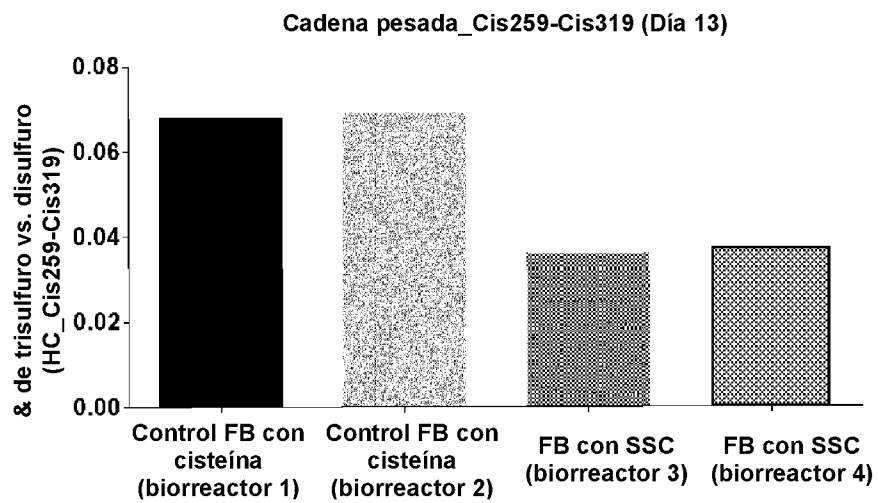


Fig. 5

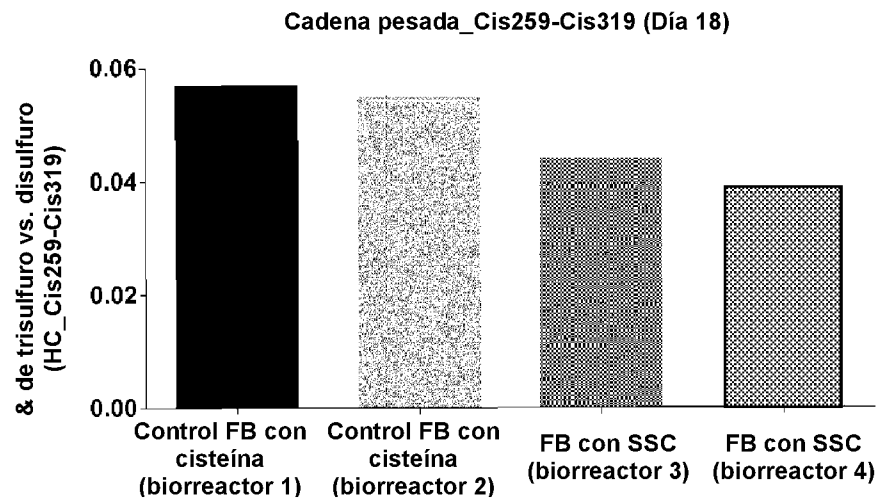


Fig. 6

