

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), que comprende:
 - 5 (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para expresar aflibercept;
 - (b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales dicha célula expresa dicho aflibercept, en donde la concentración acumulativa de níquel en dicho CDM es menor o igual a 0,4 μM , o alrededor de
10 0,4 μM , y uno o más de los siguientes:
 - i. la concentración acumulativa de hierro en dicho CDM es menor que, o igual a, 55,0 μM ;
 - ii. la concentración acumulativa de cobre en dicho CDM es menor que, o igual a 0,8 μM ;
 - 15 iii. la concentración acumulativa de zinc en dicho CDM es menor que, o igual a, 56,0 μM ;
 - iv. la concentración acumulativa de cisteína en dicho CDM es menor que, o igual a, 10,0 mM, y
 - v. dicho CDM contiene antioxidantes, en donde la concentración acumulativa
20 de un antioxidante está entre 0,001 mM y 10,0 mM aproximadamente para cualquier antioxidante individual; y
 - (c) recolectar el aflibercept producido por la célula hospedera.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha recolección tiene
25 un color no más amarillo-marrón que el color europeo estándar BY2, en donde la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.
3. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde los antioxidantes son
30 taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutatión, colina, hidrocortisona, vitamina C, Vitamina E o una combinación de los mismos.

- 5
4. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde la concentración acumulativa de un antioxidante en tal CDM es aproximadamente 0,001 mM hasta aproximadamente 10,0 mM para cualquier antioxidante individual, y la concentración acumulativa de todos los antioxidantes es menor o igual a 30,0 mM.
- 10
5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el titulador de aflibercept, la concentración de células viables, la viabilidad, el amoníaco o la osmolalidad permanecen sustancialmente inalterados.
- 15
6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tal célula hospedera se selecciona a partir del grupo que consiste en CHO, NS0, Sp2/0, células renales embrionarias y BHK.
- 20
7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tal recolección comprende una o más variantes de aflibercept, en donde tales variantes tienen al menos un residuo de aminoácido oxidado.
- 25
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque tal residuo de aminoácido oxidado se selecciona a partir del grupo que consiste en metionina, triptófano, histidina, fenilalanina, tirosina y combinaciones de los mismos.
- 30
9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el residuo de aminoácido oxidado es histidina.
10. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el residuo de aminoácido oxidado es triptofano.
11. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la variante de aflibercept comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido

seleccionada a partir del grupo que consiste en: SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.: 18, SEQ ID NO.: 19, SEQ ID NO.: 20, SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22, SEQ ID NO.: 23, SEQ ID NO.: 62, SEQ ID NO.: 63, SEQ ID NO.: 64, SEQ ID NO.: 65, SEQ ID NO.: 66, SEQ ID NO.: 67, SEQ ID NO.: 68, SEQ ID NO.: 69, SEQ ID NO.: 70, SEQ ID NO.: 71 y combinaciones de las mismas.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dichos antioxidantes son taurina, hipotaurina, glicina, ácido tióctico, glutatona, colina, hidrocortisona, Vitamina C, Vitamina E o combinaciones de los mismos.

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la recolección tiene un color que es:

- a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;
 - b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;
 - c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;
 - d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;
 - e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3; o
 - f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4, y
- en donde la concentración de aflibercept en la recolección es 5,0 g/L.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el color de la recolección es caracterizado en el espacio de color L*, a*, b*, de CIE, donde L* es aproximadamente 70 hasta aproximadamente 99, a* es aproximadamente 0 y b* es aproximadamente 20 o menos de 20 cuando la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.

15. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), caracterizado porque comprende:

- (a) proporcionar una célula hospedera diseñada por ingeniería genética para

expresar aflibercept;

(b) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las cuales dicha célula hospedera expresa tal aflibercept, en donde la concentración acumulativa de níquel en tal CDM es aproximadamente 0,4 μM y uno o más de los siguientes:

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menor que o igual a 55,0 μM ;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menor que o igual a 0,8 μM ;

iii. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menor que o igual a 56,0 μM ;

iv. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menor que o igual a 10,0 mM; y

v. dicho CDM incluye antioxidantes, donde la concentración acumulativa de un antioxidante es aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 10,0 mM para cualquier antioxidante individual; y

(c) recolectar el aflibercept producido por tal célula hospedera, donde el color de dicha cosecha es:

a. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY2;

b. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY3;

c. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY4;

d. no más amarillo-marrón que el Estándar Europeo de Color BY5;

e. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY3; o

f. entre el Estándar Europeo de Color BY2 y BY4,

en donde la concentración de aflibercept es 5,0 g/L.

16. Un método para producir aflibercept recolectado a partir de una célula hospedera cultivada en un medio químicamente definido (CDM), caracterizado porque comprende:

(a) cultivar tal célula hospedera en tal CDM bajo condiciones adecuadas en las

cuales dicha célula hospedera expresa tal aflibercept, en donde la concentración acumulativa de níquel en tal CDM es menor que o igual a $0,4 \mu\text{M}$ o aproximadamente $0,4 \mu\text{M}$ y uno o más de los siguientes;

i. la concentración acumulativa de hierro en tal CDM es menor que o igual a $55,0 \mu\text{M}$;

ii. la concentración acumulativa de cobre en tal CDM es menor que o igual a $0,8 \mu\text{M}$;

iii. la concentración acumulativa de zinc en tal CDM es menor que o igual a $56,0 \mu\text{M}$;

iv. la concentración acumulativa de cisteína en tal CDM es menor que o igual a $10,0 \text{ mM}$; y

v. dicho CDM incluye antioxidantes, donde la concentración acumulativa de un antioxidante es aproximadamente $0,001 \text{ mM}$ hasta aproximadamente $10,0 \text{ mM}$ para cualquier antioxidante individual; y

(b) recolectar el aflibercept producido por dicha célula hospedera.