



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 799**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04814038 .8**

96 Fecha de presentación : **10.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1694828**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54

Título: **Procedimiento de almacenamiento de un banco de células Vero sin suero.**

30

Prioridad: **19.12.2003 US 531379 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

73

Titular/es: **WYETH L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72

Inventor/es: **Allikmets, Ene;**
Nichols, Amy, Helen y
Plummer, Dorothy, Jean

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 799 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

Procedimiento de almacenamiento de un banco de células Vero sin suero

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un medio de congelación de células sin suero y al uso de este medio en un procedimiento para generar bancos de células sin suero estables para la producción de vacunas virales.

10 El suero bovino fetal (FBS) es un agente crioestabilizante usado comúnmente en la generación de bancos de células. Sin embargo, los sistemas de cultivo que contienen suero se están volviendo indeseables para la producción de vacunas a gran escala. Existen varias desventajas para la complementación con suero, incluyendo la variación entre lotes en la composición, el alto contenido de proteína que dificulta la purificación de producto, y el potencial de contaminación por virus, micoplasmas o priones. Además, es probable que la reciente amenaza para la salud humana causada por los agentes no definidos de la encefalopatía espongiforme bobina (EEB) limite el uso continuo de suero bovino en procedimientos de cultivo usados para la síntesis de productos de asistencia sanitaria tales como vacunas virales [Butler, y col., Biotechnol. Prog., 16, 854-858 (2000)]. Por lo tanto, es necesario un agente crioestabilizante de origen no animal para sustituir el FBS.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona un medio de congelación de células sin suero que consiste esencialmente en un medio sin suero de producción de virus (VP-SFM) complementado con (a) un hidrolizado enzimático crioestabilizante seleccionado del grupo que consiste en hidrolizado de soja e hidrolizado de arroz, añadido a aproximadamente 2 g por litro de dicho medio, y (b) dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización, el medio de congelación de células sin suero se complementa con aproximadamente el 10% de DMSO.

20 La presente invención proporciona además el uso de este medio de congelación de células sin suero en un procedimiento que genera bancos de células maestros y de trabajo normalizados y uniformes, que se usan como material bruto en la producción de vacunas. Este procedimiento comprende las etapas de:

25 (a) iniciar un cultivo, que comprende descongelar células Vero congeladas y añadirlas a medios de cultivo en un matraz T-150 cm², en el que el medio de cultivo consiste en VP-SFM con L-glutamina 4 mM, incubar las células durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5%, y volver a nutrir el cultivo con medio de cultivo recién preparado al día siguiente;

30 (b) propagar y amplificar las células, lo que comprende cultivar las células hasta la confluencia en el matraz T-150 cm² incubado a 37 °C y CO₂ al 5%, retirar el medio, lavar el matraz con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, añadir tripsina al matraz e incubarlo a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para desprender las células del matraz, neutralizar la tripsina con inhibidor de tripsina de soja (STI) y añadir VP-SFM como sustento nutricional, sembrar la suspensión resultante en cinco matraces T-150 cm² y añadir VP-SFM a cada matraz a un nivel de 50 ml, incubar las células a 37 °C y CO₂ al 5% durante de tres a cuatro días, combinar las suspensiones de células de los cinco matraces, sembrar una fábrica de células con la suspensión combinada, volver a nutrir la fábrica de células y recoger la fábrica de células; y

35 (c) congelar el banco de células, lo que comprende centrifugar las células recogidas de la fábrica de células durante 10 minutos a 210 x g a 4 °C, resuspender las células en el medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 1 a una densidad de 2 x 10⁶ a 2 x 10⁷ células/ml, dispensar la suspensión de células en crioviales a un ml de suspensión de células por vial, congelar las células usando un congelador con control activo de la velocidad, y almacenar las células en nitrógeno líquido, en el que el banco de células Vero sin suero estable producido de este modo tiene una viabilidad celular de al menos el 80% y un tiempo de duplicación a la recuperación de entre 40 y 60 horas después de un año.

En una realización específica, este procedimiento comprenden las etapas de:

45 (a) iniciar un cultivo, que comprende descongelar 2 x 10⁷ células Vero congeladas y añadirlas a 50 ml de medio de cultivo en un matraz T-150 cm² para obtener una densidad celular de 4-5 x 10⁵ células/ml, en el que el medio de cultivo consiste en VP-SFM con L-glutamina 4 mM, incubar las células durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5% y volver a nutrir el cultivo con medio de cultivo recién preparado al día siguiente;

50 (b) propagar y amplificar las células, lo que comprende cultivar las células hasta la confluencia en el matraz T-150 cm² incubado a 37 °C y CO₂ al 5%, retirar el medio, lavar el matraz dos veces con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, añadir 5 ml de tripsina al matraz e incubarlo a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para desprender las células del matraz, neutralizar la tripsina con 5 ml de inhibidor de tripsina de soja (STI) y añadir 10 ml de VP-SFM como sustento nutricional, sembrar la suspensión resultante en cinco matraces T-150 cm² a una concentración de 4 x 10⁴ células/cm² y añadir VP-SFM a cada matraz a un nivel de 50 ml, incubar las células a 37 °C y CO₂ al 5% durante de tres a cuatro días, combinar las suspensiones de células de los cinco matraces, sembrar una fábrica de células con la suspensión combinada, volver a nutrir la fábrica de células y recoger la fábrica de células; y

55 (c) congelar el banco de células, lo que comprende centrifugar las células recogidas de la fábrica de células durante 10 minutos a 210 x g a 4 °C, resuspender las células en el medio de congelación de células sin suero

descrito anteriormente a una densidad de $1-2 \times 10^7$ células/ml, dispensar la suspensión de células en crioviales a 1 ml de suspensión de células por vial, congelar las células usando un congelador con control activo de la velocidad, y después almacenar las células en nitrógeno líquido, en el que el banco de células Vero sin suero estable producido de este modo tiene una viabilidad celular de al menos el 80% y un tiempo de duplicación a la recuperación de entre 40 y 60 horas después de un año.

La presente invención proporciona además un banco de células Vero sin suero estable para la producción de vacunas producido por el procedimiento descrito inmediatamente anteriormente, en el que el promedio de la viabilidad del banco de células es de al menos el 80% y el promedio del tiempo de duplicación a la recuperación es de entre 40 y 60 horas después de un año.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un esquema de aumento a escala para bancos de células de 100 viales. Los bancos de células de 200 viales y 400 viales siguen el mismo esquema, usando dos fábricas de células y cuatro fábricas de células, respectivamente.

La FIG. 2 es una gráfica que compara las viabilidades celulares de bancos de células sin suero de 10 viales que contienen crioestabilizantes de origen vegetal con las de bancos de células que contienen FBS.

La FIG. 3 es una gráfica que compara los tiempos de duplicación a la recuperación de bancos de células sin suero de 10 viales que contienen crioestabilizantes de origen vegetal con los de bancos de células que contienen FBS.

La FIG. 4 es una gráfica que compara las viabilidades celulares de bancos de células a gran escala (100, 200 y 400 viales) que se generaron usando Hy-Soy® y HyPep® Rice como crioestabilizantes.

La FIG. 5 es una gráfica que compara los tiempos de duplicación a la recuperación de bancos de células a gran escala (100, 200 y 400 viales) que se generaron usando Hy-Soy y HyPep Rice como crioestabilizantes.

Descripción detallada de la invención

La puesta en práctica de un procedimiento de generación de bancos de células normalizado y correcto es fundamental para el suministro de reservas de células con un rendimiento y características uniformes. La generación de bancos de células debería incluir un banco de células maestro de células fuente homogéneas y numerosos bancos de células de trabajo generados a partir del banco de células maestro. El número de viales de un banco dado variará dependiendo del uso deseado, pero un banco de células maestro típico puede contener 200 viales y un banco de células de trabajo típico puede contener hasta 400 viales, utilizando el procedimiento de generación de bancos de la presente invención. Este procedimiento asegura un suministro a largo plazo de células normalizadas que proporcionarán un sustrato estable para una producción uniforme.

Las células Vero (células de riñón de mono verde africano inmortalizadas, ATCC nº CCI-81) se han conocido y usado en la técnica para la producción de vacunas virales humanas durante muchos años. Las células están bien caracterizadas y tienen un registro de seguridad excelente.

El procedimiento de generación de bancos de células Vero sin suero de la presente invención consiste de tres etapas principales: iniciar el cultivo, propagar y amplificar las células y congelar el banco. La optimización de cada una de estas etapas ha hecho posible generar bancos de células sin suero de alta calidad. La expresión "alta calidad" significa que la viabilidad de las células es alta y la recuperación es rápida, es decir, el tiempo de duplicación a la recuperación es reducido. La combinación de estas condiciones de cultivo y congelación de células da como resultado una recuperación mejorada de células Vero. Dos de los parámetros de recuperación más importantes para una producción uniforme de células a partir de un banco de células son el tiempo de recuperación y la viabilidad a la descongelación. El tiempo de recuperación está estrechamente relacionado con la eficacia de siembra en placas, pero también proporciona más información acerca del rendimiento de las células después de la descongelación. Ambos parámetros se midieron y se usaron para optimizar el presente procedimiento de generación de bancos de células.

Se eliminó el rojo fenol del medio de congelación de células debido a informes de que este componente podría tener efectos estrogénicos sobre las células [Berthois, y col. Cell Biology, 83, 2496-5000 (1986)]. La composición del medio de congelación de células se optimizó para que contuviera Hy-Soy 2 g/l (o HyPep Rice), DMSO al 10 % y el resto VP-SFM como medio de cultivo.

El "VP-SFM" usado en el presente documento estaba representado por VP-SFM Gibco™ (disponible en el mercado de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) modificado para que contuviera los ingredientes enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1

VP-SFM GIBCO (modificado)		
L-Alanina	Fosfato sódico dibásico anhidro	Putrescina 2HCl
Glicina	Sulfato de magnesio anhidro	Insulina humana recombinante
L-Alanina	Fosfato sódico dibásico anhidro	Putrescina 2HCl
L-Arginina HCl	Cloruro de calcio anhidro	Factor de crecimiento epidérmico (EGF), recombinante
L-Asparagina H ₂ O	D-Pantotenato de calcio	Fosfato sódico dibásico anhidro
L-Ácido aspártico	Cloruro de magnesio anhidro	Fosfato sódico monobásico H ₂ O
L-Cisteína HCl H ₂ O	Sal 2-fosfato magnésica del ácido ascórbico	HEPES
L-Cistina 2HCl	Cloruro sódico	Complejo de citrato férrico
L-Ácido glutámico	Acetato de vitamina A	Sulfato de adenina
Glutión reducido	Vitamina D ₂	Adenosina-5-trifosfato
L-Histidina HCl H ₂ O	Menadiona	D-Glucosa (Dextrosa)
L-Isoleucina	Ácido DL-lipoico tióctico	Vitamina B ₁₂
L-Leucina	Ácido linoleico	Cloruro de colina
L-Lisina HCl	Uracilo	I-Inositol
L-Metionina	Timidina	Niacinamida
L-Fenilalanina	Biotina	Piridoxal HCl
L-Prolina	Ácido fólico	2-Desoxirribosa
L-Serina	Riboflavina	Etanolamina HCl
L-Treonina	Hipoxantina sódica	Fosfoetanolamina
L-Triptófano	Xantina sódica	Cloruro de potasio
L-Valina	Ácido para-aminobenzoico	Piruvato sódico
Tiamina HCl	Ácido nicotínico	Hidrolizado vegetal patentado
Sal disódica de L-tirosina	Piridoxina HCl	Extracto de levadura UF

5 Como una mejora del procedimiento, el cultivo se inició a partir del doble de densidad celular de lo habitual en la técnica. Por lo tanto, en lugar de partir de un vial, el cultivo se inició a partir de dos viales congelados del banco fuente descongelados en un matraz T-150 cm². Se añadió VP-SFM templado gota a gota para evitar el choque o daño de las células. El volver a nutrir el cultivo al día siguiente después de la descongelación elimina el criostabilizante restante y los residuos celulares y mejora la recuperación.

10 El esquema de aumento a escala y el programa de la presente invención permite la propagación de células Vero con un número mínimo de pases (por ejemplo, no más de cuatro pases) y manipulaciones, manteniendo al mismo tiempo la concentración de células sistemáticamente alta para mantener un cultivo sano. El esquema de aumento a escala es: dos viales congelados del banco fuente descongelados en un matraz T-150 cm², expandidos en cinco matraces T-150 cm² que se usan para inocular una fábrica de células de 10 bandejas. Puede generarse un banco de células de 100 viales a partir de una fábrica de células. Este esquema permite un fácil ajuste en el tamaño del banco.

15 El esquema de tratamiento con tripsina también se optimizó. Se descubrió que dos aclarados con tampón de la monocapa de células eran óptimos para una buena recuperación después de la descongelación. Se escogió tripsina porcina irradiada con gamma para minimizar posible contaminación viral. Debido a que una transferencia de calor suficiente a los diez niveles de la fábrica de células es cuestionable, creando microentornos innecesarios, el tratamiento con tripsina se realiza a temperatura ambiente con tripsina refrigerada.

20 La combinación de condiciones del procedimiento de congelación mejoraba la recuperación del banco considerablemente. En primer lugar, la suspensión de células recogida y combinada se centrifuga a 210 x g durante 10 minutos en lugar de 5 ó 7 minutos, lo que causa una pérdida de células considerable. La resuspensión se realiza suavemente con medio de congelación frío. En segundo lugar, la dispensación de las células en crioviales con una pipeta de repetición hizo que el procedimiento de dispensación fuera más rápido y redujo el tiempo que las células tenían que estar expuestas al medio de congelación antes del ciclo de congelación real. Y en tercer lugar, la suspensión de células durante la dispensación en crioviales y los viales ya llenos se enfriaban hasta 2-8 °C.

30 Tenían que abordarse dos aspectos de la crioconservación de células Vero para el procedimiento de generación de bancos: la densidad celular óptima en el criovial y la programación del congelador con control de la velocidad para una buena recuperación de las células tras la descongelación. Durante el cambio de fase, a medida que se congela un material se libera el calor de transición de líquido a sólido (el calor de fusión). El programa se optimizó de modo que estuviera representado el calor de fusión, forzando a la muestra a congelarse a una velocidad constante. Se demostró claramente que la densidad celular óptima era de 1-2 X 10⁷ células/ml y que las modificaciones en el programa de congelación estaban contribuyendo a la buena recuperación de las células.

5 El procedimiento de generación de bancos de células Vero sin suero de la presente invención proporciona una forma normalizada y uniforme para generar bancos de células fiables y estables para la producción de vacunas virales. Se sustituyeron productos de origen animal en los medios de cultivo y de congelación por sustancias de origen vegetal tales como Hy-Soy y HyPep Rice, que sirven como criostabilizantes. Los resultados muestran que los bancos de células sin suero que usan Hy-Soy 2 g/l o HyPep Rice 2 g/l son estables durante al menos un año.

10 Las mejoras que dan como resultado el presente procedimiento de generación de bancos de células aumentan la viabilidad de las células tras la descongelación y reducen el tiempo de recuperación, lo que permite un programa más exacto de fabricación y procedimientos más uniformes. También es posible ahora que el procedimiento de fabricación comience a partir de un número menor de viales congelados. Por lo tanto, un banco de 400 viales de tamaño completo durará más tiempo y los procesamientos consecutivos serán más uniformes.

Habiendo descrito ahora la invención en general, la misma se entenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Ejemplos

15 Se ensayaron varios agentes como criostabilizantes en este estudio. Se compararon bancos de células que contenían Hy-Soy, HyPep Rice, HyPep Wheat y metilcelulosa con bancos de células que contenían FBS, y se examinó la estabilidad de los bancos de células. Se demostró que el Hy-Soy y el HyPep Rice eran tan eficaces como el FBS como criostabilizantes durante el primer año del estudio. Por lo tanto, el Hy-Soy puede usarse en bancos de células sin suero y el HyPep Rice puede usarse como alternativa.

20 Materiales y procedimientos

Equipo de protección personal: Guantes estériles, mangas estériles, mono estéril, gorros de zona limpia, mascarillas de zona limpia y calzas de zona limpia.

Equipo desechable: Pipetas serológicas desechables; crioviales Sarstedt de 1,8 ml; matraces de cultivo de tejidos Corning Costar 75 cm² y 150 cm²; fábricas de células Nunc de diez bandejas [www.nuncbrand.com].

25 *Material de vidrio y accesorios:* Campana de vidrio con tubo C-flex para dispensar medio a partir de contenedores de medio de 10 l y 20 l; filtros Gelman con tubo C-flex; adaptadores de fábricas de células; frascos de 500 ml, 1 l, 2 l y 5 l con aparato de transferencia y tubo; pera de goma.

30 *Reactivos:* VP-SFM de Gibco™ formulado para que contuviera los ingredientes de la Tabla 1; inhibidor de tripsina de soja (STI) Gibco; L-glutamina Gibco; solución salina tamponada con fosfato (PBS) Gibco sin calcio ni magnesio; albúmina de suero bobino (BSA) Gibco; Hy-Soy, HyPep Rice y HyPep Wheat de Quest International (Norwich, NY); dimetilsulfóxido (DMSO) y metilcelulosa Sigma (St. Louis, MO); alcohol isopropílico al 70%; citrato/tripsina irradiada al 0,25% Gibco; tampón citrato sódico 0,025 M Gibco, suero bobino fetal (FBS) o FBS irradiado (irFBS) Hyclone (Logan, UT); medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco; agua para inyección o agua desionizada; solución de azul tripán al 0,05% Gibco.

35 *Equipo:* Campana de bioseguridad; campana de flujo laminar o cabina de bioseguridad; base de matraz de agitación; pipeta automática (de repetición); microscopio; microscopio invertido; hemocitómetro; baño de agua circulante; congelador con control de la velocidad (RCF) Forma Cryomed; bomba peristáltica; bomba de dosificación; incubadora Forma a 37 °C y CO₂ al 5%; centrifuga Forma; rotor de tipo cubo de balanceo 216.

Ejemplo 1

40 Descongelación y cultivo de células

45 Se pusieron dos viales de reserva congelados que contenían 2×10^7 células Vero en un baño de agua a 37 °C. Los viales se mantuvieron en el baño de agua con agitación y se comprobaron frecuentemente hasta que se descongelaron las células congeladas. La parte externa de los viales se desinfectó con alcohol isopropílico al 70% y se pusieron en una campana de flujo laminar. Las células descongeladas se transfirieron rápidamente a un matraz T-150 cm² y se añadieron 50 ml de medio de cultivo gota a gota mientras que se balanceaba el recipiente de cultivo. El medio de cultivo consistía en VP-SFM con L-glutamina 4 mM. Después de que se añadiera aproximadamente la mitad del medio, el resto se añadió a una velocidad ligeramente más rápida. Las células se pusieron en una incubadora Forma (37 °C, al 5%) y se dejó que se unieran durante una noche. El medio se retiró por aspiración y se añadieron 50 ml de medio de cultivo recién preparado al matraz al día siguiente.

50 Ejemplo 2

Pase de las células

Las células se cultivaron hasta la confluencia (4 ó 5 días) en el matraz T-150 cm² incubado a 37 °C y CO₂ al 5% en la incubadora Forma. El medio se retiró por aspiración y el matraz se lavó dos veces con 20 ml de PBS, sin

magnesio ni calcio. Se añadieron cinco ml de tripsina al matraz y el matraz se incubó a temperatura ambiente durante de 2 a 3 minutos para eliminar las células del matraz. La tripsina se neutralizó con 5 ml de STI y se añadieron 10 ml de VP-SFM como sustento nutricional hasta que se hubiera completado el procedimiento. Se obtuvieron muestras de las células, ahora en suspensión, para su recuento. Se añadió un ml de solución de azul tripán a una muestra de células de un ml. Esta se agitó suavemente con un agitador vorticial. Se pusieron diez μ l de mezcla en la cámara de un hemocitómetro. Las células que resistían a la tinción se contaron como vivas y se determinó el recuento de células totales.

La suspensión de células se sembró después en cinco matraces T-150 cm^2 nuevos a una concentración de 4×10^4 células/ cm^2 . Se añadió VP-SFM a cada matraz T-150 cm^2 a un nivel de 50 ml, y después los matraces se pusieron en el incubador Forma a 37°C y CO₂ al 5%. Tres días después, los matraces se volvieron a nutrir. Los matraces se incubaron durante un total de cinco días. Las suspensiones de células de los cinco matraces se combinaron y la suspensión combinada se usó para sembrar una fábrica de células Nunc. Una fábrica de células confluentes produce suficientes células para un banco de células de 100 viales.

Ejemplo 3

15 Preparación y siembra de una fabrica de células

Uno de los adaptadores proporcionados por Nunc para la fábrica de células se conectó a una pieza de 10 pulgadas de tubo de silicona (DI 0,48 cm, DE 0,95 cm). Se usó un conector de tubo para unir una longitud de 20,32 cm de tubo C-flex (DI 0,32 cm, DE 0,51 cm) al tubo de silicona conectado a la fábrica de células. Éste es el adaptador de entrada/salida. Ambos extremos del tubo se envolvieron con Bioshield. El segundo adaptador proporcionado por Nunc para la fábrica de células se unió a una pieza de 7,62 cm de tubo de silicona (DI 0,48 cm, DE 0,95 cm) con un filtro Gelman pequeño (0,22 μ m). El extremo adaptador se envolvió con Bioshield. Ambos adaptadores se autoclavaron durante 30 minutos con un tiempo de secado de 15 minutos. En la cabina de bioseguridad (BSC), los adaptadores se unieron a la fábrica de células siguiendo el manual de instrucciones proporcionado por Nunc. Cualquier orificio de la fábrica de células puede usarse para el conducto de entrada/salida y el conducto de ensamblaje del filtro. Se obtuvo una bolsa de 10 l de VP-SFM o 3 frascos de 1 l de la cámara fría y se calentaron a 37 °C. Los conductos de transferencia de C-flex de cinco l se pusieron en frascos de 5 l estériles para la siembra de células. Todas las bolsas usadas estaban provistas de C-flex por el fabricante. El dispositivo de conexión estéril (SCD) se usó para conectar el medio al frasco de siembra y se dispensaron 2,5 l de medio al frasco de siembra. Se añadió una suspensión de células al frasco de siembra. El SCD se usó para conectar el frasco de siembra a la fábrica de células. La fábrica de células se puso en la posición de llenado y vaciado. El medio con células se bombeó a mano lentamente hacia la fábrica de células. El tubo de silicona conectado al conducto de entrada/salida se pinzó inmediatamente. Se conectó un filtro Gelman de 0,22 μ m (Acro 50) con C-flex a la fábrica de células usando el SCD. La fábrica de células se puso en la posición de comprobación del nivel. Cuando el líquido estaba distribuido uniformemente en los diez niveles, la fábrica de células se puso en la posición horizontal y se puso en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5%.

Ejemplo 4

Renutrición de la fábrica de células

Se volvió a nutrir la fábrica de células los días 2 y 5 después de la siembra. Usando el SCD, la bolsa vacía se conectó a la fábrica de células. La fábrica de células se puso suavemente en la posición de llenado y vaciado y se marcó el nivel de líquido. La bolsa vacía se puso en el suelo para ayudar a drenar el medio. A veces era necesario presurizar la fábrica de células. Se conectó una pera de goma al ensamblaje del filtro para presurizar suavemente la fábrica de células. Una vez que comenzó el flujo, se desconectó la pera de goma. Cuando se vació el medio, la bolsa que contenía el medio de renutrición se conectó a la fábrica de células usando el SCD y el mismo volumen de medio se bombeó a mano lentamente hacia la fábrica de células. La fábrica de células se puso en la posición de comprobación del nivel. Después de que se completase la comprobación del nivel, la fábrica de células se puso en su posición de trabajo horizontal en la incubadora de 37 °C, CO₂ al 5%.

Ejemplo 5

Recogida de la fábrica de células

La fábrica de células se drenó como se ha descrito anteriormente. El primer lavado consistía en 300 ml de tampón citrato sódico 25 mM o 300 ml de PBS sin calcio ni magnesio. El primer lavado se bombeó hacia la fábrica de células. Se dejó que el lavado se igualara en cada nivel. La fábrica de células se agitó suavemente para aclarar todas las superficies de células. El primer lavado se drenó y se aplicó un segundo lavado de la misma forma que el primer lavado. El segundo lavado se drenó y se unió un frasco de solución de tripsina (1,4 ml de tripsina al 2,5% Gibco en 300 ml de tampón citrato sódico 2,5 mM) a la fábrica de células. La solución de tripsina se bombeó hacia la fábrica de células y la fábrica de células se balanceó suavemente de modo que se cubrieran todas las superficies de células. La superficie de células se examinó cada 2 ó 3 minutos para ver si las células habían comenzado a desprenderse. Cuando las células comenzaron a desprenderse de la superficie de la fábrica de células, la fábrica de

células se golpeó intensamente para liberar el resto de las células. Esto se realizó hasta que la fábrica de células parecía transparente. La fábrica de células se conectó entonces a un frasco de recogida de células que contenía 100 ml de inhibidor de tripsina de soja (STI) 5 mg/ml. La mezcla de células se drenó hacia este frasco. El frasco de lavado de medio se conectó a la fábrica de células, teniéndose cuidado de pinzar el frasco de recogida de células. El frasco que contenía 600 ml de medio de cultivo se unió a la fábrica de células para aclarar las superficies. La fábrica de células se volvió a conectar al frasco de recogida de células y se drenó el medio de aclarado. Este lavado puede contener hasta 1/3 de las células totales.

Ejemplo 6

Protocolo de Congelación

Se obtuvo muestras de las células recogidas de matraces o fábricas de células Nunc para su recuento, se combinaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 210 x g a 4 °C en la centrífuga Forma. Se preparó medio de congelación de células que consistía esencialmente en VP-SFM complementado con DMSO al 10% y 2 g/l de uno de los crioprotectores ensayados en este estudio. Las células se mantuvieron en hielo durante el procedimiento. Después, las células se resuspendieron en el medio de congelación a una densidad de $1,5 \times 10^7$ células/ml. El concentrado de células se puso en crioviales Sarstedt de 1,8 ml a un ml de suspensión de células por vial. Las células se congelaron usando un congelador con control activo de la velocidad. Después de la congelación, las células se almacenaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 7

Bancos de células

Bancos de células: Los experimentos iniciales que examinan diversos crioprotectores se efectuaron usando bancos de células de 10 viales obtenidos de matraces T. Basándose en los resultados de los bancos de células de 10 viales, los crioprotectores prometedores se usaron en bancos de células de mayor tamaño de 100, 200 y 400 viales. Las células necesarias para los bancos de células a gran escala se cultivaron en fábricas de células.

Expansión de células para bancos de células a gran escala: La expansión de células para bancos de células se realizó de la forma siguiente. Se descongelaron dos viales de células congeladas por cada 100 viales del banco de células a generar. Se usaron dos viales para inocular un matraz T-150 cm². El matraz T-150 cm² se volvió a nutrir al día siguiente. Después de 4 días de cultivo, las células se dividieron en cinco matraces T-150 cm². Tres días después de la división, se volvió a nutrir los matraces. Los matraces se incubaron durante cinco días. Los matraces se recogieron y se usaron para inocular una fábrica de células de 10 capas Nunc. Se volvió a nutrir la fábrica de células después de dos y cinco días. El séptimo día, se recogió la fábrica de células. Véase la FIG. 1 para el programa de etapas usado para preparar los bancos de células.

Ensayo de bancos de células: Se descongelaron cinco viales de cada banco de células como se describe en el Ejemplo 1. Cada vial se usó para sembrar dos matraces T-75 cm² que contenían 25 ml de VP-SFM. Se recogieron las células de los matraces cuando estaban próximas a la confluencia y al día siguiente. Se determinaron los tiempos de duplicación usando el recuento de células y el tiempo de cultivo. La viabilidad celular se determinó con azul tripán como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión

Recuperación del banco de células: Se usaron dos parámetros para determinar la estabilidad del banco de células: el tiempo de duplicación a la recuperación de las células (matraces recogidos y contados cuando estaban próximos a la confluencia y al día siguiente) y la viabilidad de las células después de la descongelación. Las células se descongelaron inmediatamente después de la congelación y a diversos puntos temporales. Las células se ensayaron inmediatamente para determinar su viabilidad y se pusieron en matraces T. Los matraces T se recogieron para determinar los tiempos de duplicación a la recuperación de las células.

Banco de células Vero de diez viales (véanse las FIGS. 2 y 3): En la Figura 2, se tomó el promedio de cinco muestras de cada banco de células a diversos puntos temporales. Las muestras se descongelaron rápidamente y se determinó la viabilidad usando azul tripán. En la Figura 3 se tomó el promedio de cinco muestras de cada banco de células a diversos puntos temporales. Las muestras se descongelaron rápidamente y se pusieron en matraces T. Las células se contaron periódicamente para determinar los tiempos de duplicación a la recuperación. Todos los bancos de células tenían una viabilidad superior al 90% después de almacenarse en nitrógeno líquido durante un año. El banco de células con sólo DMSO al 10% y el banco de células con metilcelulosa al 0,1% disminuían por debajo del 80% a los 15 meses. También se observó que la recuperación del banco de metilcelulosa era muy escasa con tiempos de duplicación de más de 100 horas, en comparación con los tiempos de duplicación de 45 a 50 horas de los otros bancos de células. El Hy-Soy, HyPep Rice y HyPep Wheat tenían todos los tiempos de duplicación y viabilidades que se observaron en los bancos de células de control (bancos que contenían FBS). Basándose en estos datos, se generaron bancos de células a gran escala de 100, 200 y 400 viales usando Hy-Soy y HyPep Rice como crioprotectores.

Bancos de células a gran escala (véanse las FIGS. 4 y 5): En la Figura 4 se tomó el promedio de cinco muestras de cada banco de células a diversos puntos temporales. Las muestras se descongelaron rápidamente y se pusieron en matraces T. Las células se contaron periódicamente para determinar los tiempos de duplicación a la recuperación. En la Figura 5, se tomó el promedio de cinco muestras de cada banco de células a diversos puntos temporales. Las muestras se descongelaron rápidamente y se determinó la viabilidad usando azul tripán. La viabilidad de los bancos de células de cien viales que contenían Hy-Soy y HyPep Rice continuaba siendo superior al 80% durante nueve meses. La recuperación de las células también continuaba siendo sistemáticamente de un tiempo de duplicación de entre 45 y 60 horas. Estos resultados concuerdan con los bancos de células que contienen suero (véanse las FIGS. 2 y 3). El banco Hy-Soy de 200 viales y el banco Hy-Soy de 400 viales mostraban también una viabilidad superior al 80% y tiempos de duplicación a la recuperación de entre 40 horas y 60 horas a lo largo de un periodo de doce meses. Los bancos de células a gran escala Hy-Soy y HyPep Rice eran todos comparables a los bancos de células que contenían FBS. De los resultados experimentales anteriores puede concluirse que los bancos de células sin suero que usaban Hy-Soy 2 g/l o HyPep Rice 2 g/l eran estables durante hasta un año.

La presente invención se ha descrito mediante una descripción directa y mediante ejemplos. Como se ha señalado anteriormente, los ejemplos pretenden ser solamente ejemplos y no limitar la invención de ninguna forma significativa. Además, un experto en la materia a la que pertenece la presente invención apreciará, al revisar la memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, que existen equivalentes respecto a los aspectos de la invención reivindicados. Los inventores pretenden incluir esos equivalentes dentro del alcance razonable de la invención reivindicada.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de congelación de células sin suero, que consiste esencialmente en un medio sin suero de producción de virus (VP-SFM) complementado con (a) un hidrolizado enzimático crioestabilizante seleccionado del grupo que consiste en hidrolizado de soja e hidrolizado de arroz, añadido a aproximadamente 2 g por litro de dicho medio, y (b) dimetilsulfóxido (DMSO).
2. El medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 1, que está complementado con aproximadamente el 10% de DMSO.
3. Un procedimiento para generar un banco de células Vero sin suero estable, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) iniciar un cultivo, que comprende descongelar células Vero congeladas y añadirlas a medio de cultivo en un matraz T-150 cm², en el que el medio de cultivo consiste en VP-SFM con L-glutamina 4 mM, incubar las células durante una noche a aproximadamente 37 °C y CO₂ al 5%, y volver a nutrir el cultivo con medio de cultivo recién preparado al día siguiente;
- (b) propagar y amplificar las células, lo que comprende cultivar las células hasta la confluencia en el matraz T-150 cm² incubado a 37 °C y CO₂ al 5%, retirar el medio, lavar el matraz con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, añadir tripsina al matraz e incubarlo a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para desprender las células del matraz, neutralizar la tripsina con inhibidor de tripsina de soja (STI) y añadir VP-SFM como sustento nutricional, sembrar la suspensión resultante en cinco matraces T-150 cm² y añadir VP-SFM a cada matraz a un nivel de 50 ml, incubar las células a aproximadamente 37 °C y CO₂ al 5% durante de tres a cuatro días, combinar las suspensiones de células de los cinco matraces, sembrar una fábrica de células con la suspensión combinada, volver a nutrir la fábrica de células y recoger la fábrica de células; y
- (c) congelar el banco de células, lo que comprende centrifugar las células recogidas de la fábrica de células durante 10 minutos a 210 x g a 4 °C, resuspender las células en el medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 1 a una densidad de 2 x 10⁶ a 2 x 10⁷ células/ml, dispensar la suspensión de células en crioviales a un ml de suspensión de células por vial, congelar las células usando un congelador con control activo de la velocidad, y almacenar las células en nitrógeno líquido, en el que el banco de células Vero sin suero estable producido de este modo tiene una viabilidad celular de al menos el 80% y un tiempo de duplicación a la recuperación de entre 40 y 60 horas después de un año.
4. Un procedimiento para generar un banco de células Vero sin suero estable de acuerdo con la reivindicación 3, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) iniciar un cultivo, que comprende descongelar 2 x 10⁷ células Vero congeladas y añadirlas a 50 ml de medio de cultivo en un matraz T-150 cm² para obtener una densidad celular de 4-5 x 10⁵ células/ml, en el que el medio de cultivo consiste en VP-SFM con L-glutamina 4 mM, incubar las células durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5%, y volver a nutrir el cultivo con medio de cultivo recién preparado al día siguiente;
- (b) propagar y amplificar las células, lo que comprende cultivar las células hasta la confluencia en el matraz T-150 cm² incubado a 37 °C y CO₂ al 5%, retirar el medio, lavar el matraz dos veces con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, añadir 5 ml de tripsina al matraz e incubarlo a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para desprender las células del matraz, neutralizar la tripsina con 5 ml de inhibidor de tripsina de soja (STI) y añadir 10 ml de VP-SFM modificado como sustento nutricional, sembrar la suspensión resultante en cinco matraces T-150 cm² a una concentración de 4 x 10⁴ células/cm² y añadir VP-SFM a cada matraz a un nivel de 50 ml, incubar las células a 37 °C y CO₂ al 5% durante de tres a cuatro días, combinar las suspensiones de células de los cinco matraces, sembrar una fábrica de células con la suspensión combinada, volver a nutrir la fábrica de células y recoger la fábrica de células; y
- (c) congelar el banco de células, lo que comprende centrifugar las células recogidas de la fábrica de células durante 10 minutos a 210 x g a 4 °C, resuspender las células en el medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 2 a una densidad de 1-2 x 10⁷ células/ml, dispensar la suspensión de células en crioviales a un ml de suspensión de células por vial, congelar las células usando un congelador con control activo de la velocidad, y almacenar las células en nitrógeno líquido, en el que el banco de células Vero sin suero estable producido de este modo tiene una viabilidad celular de al menos el 80% y un tiempo de duplicación a la recuperación de entre 40 y 60 horas después de un año.
5. El medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 1 ó 2, en el que el hidrolizado enzimático crioestabilizante es un hidrolizado de soja.
6. El medio de congelación de células sin suero de la reivindicación 1 ó 2, en el que el hidrolizado enzimático crioestabilizante es un hidrolizado de arroz.
7. Un banco de células Vero estable que tiene una viabilidad celular de al menos el 80% y un tiempo de duplicación a la recuperación de entre 40 y 60 horas después de un año de congelación, en el que el banco de células está libre de productos de origen animal, y en el que el banco de células se genera usando un hidrolizado enzimático crioestabilizante que comprende un hidrolizado de soja o un hidrolizado de arroz.

DOMINGO	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO
	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
	DESCONGELAR DOS VIALES DE CÉLULAS VERO EN UN MATRAZ T-150	VOLVER A NUTRIR EL MATRAZ T-150			DIVIDIR EL MATRAZ T-150 EN CINCO MATRACES T-150 RECIÉN PREPARADOS	
DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 12
	VOLVER A NUTRIR CINCO MATRACES T-150		SEMBRAR UNA FÁBRICA DE CÉLULAS NUNC CON CINCO MATRACES T-150		VOLVER A NUTRIR LA FÁBRICA DE CÉLULAS NUNC	
DÍA 13	DÍA 14	DÍA 15	DÍA 16	DÍA 17	DÍA 18	DÍA 19
	VOLVER A NUTRIR LA FÁBRICA DE CÉLULAS NUNC		RECOGER LA FÁBRICA DE CÉLULAS NUNC. CONGELAR EL BANCO DE CÉLULAS			

FIG. 1

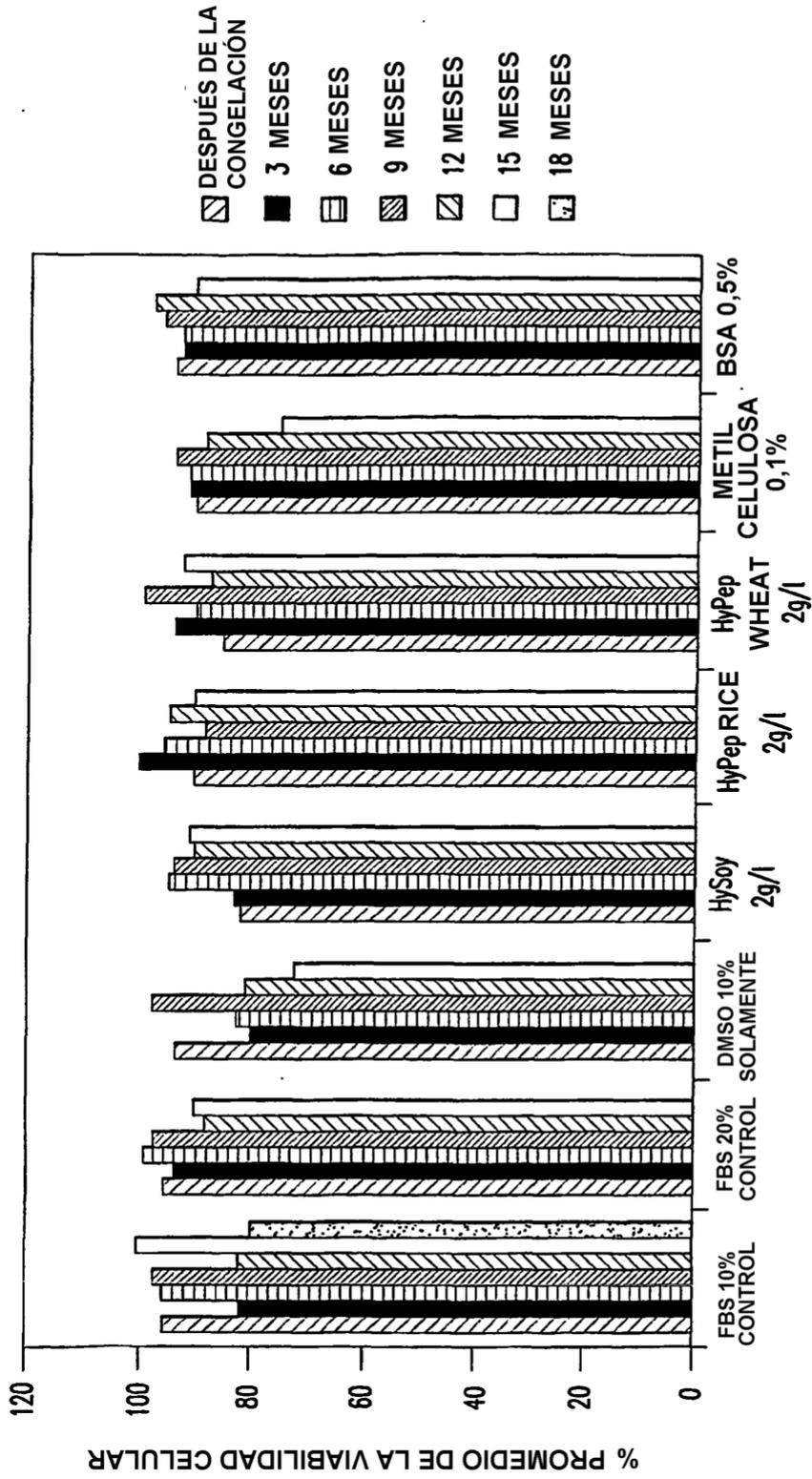


FIG.2

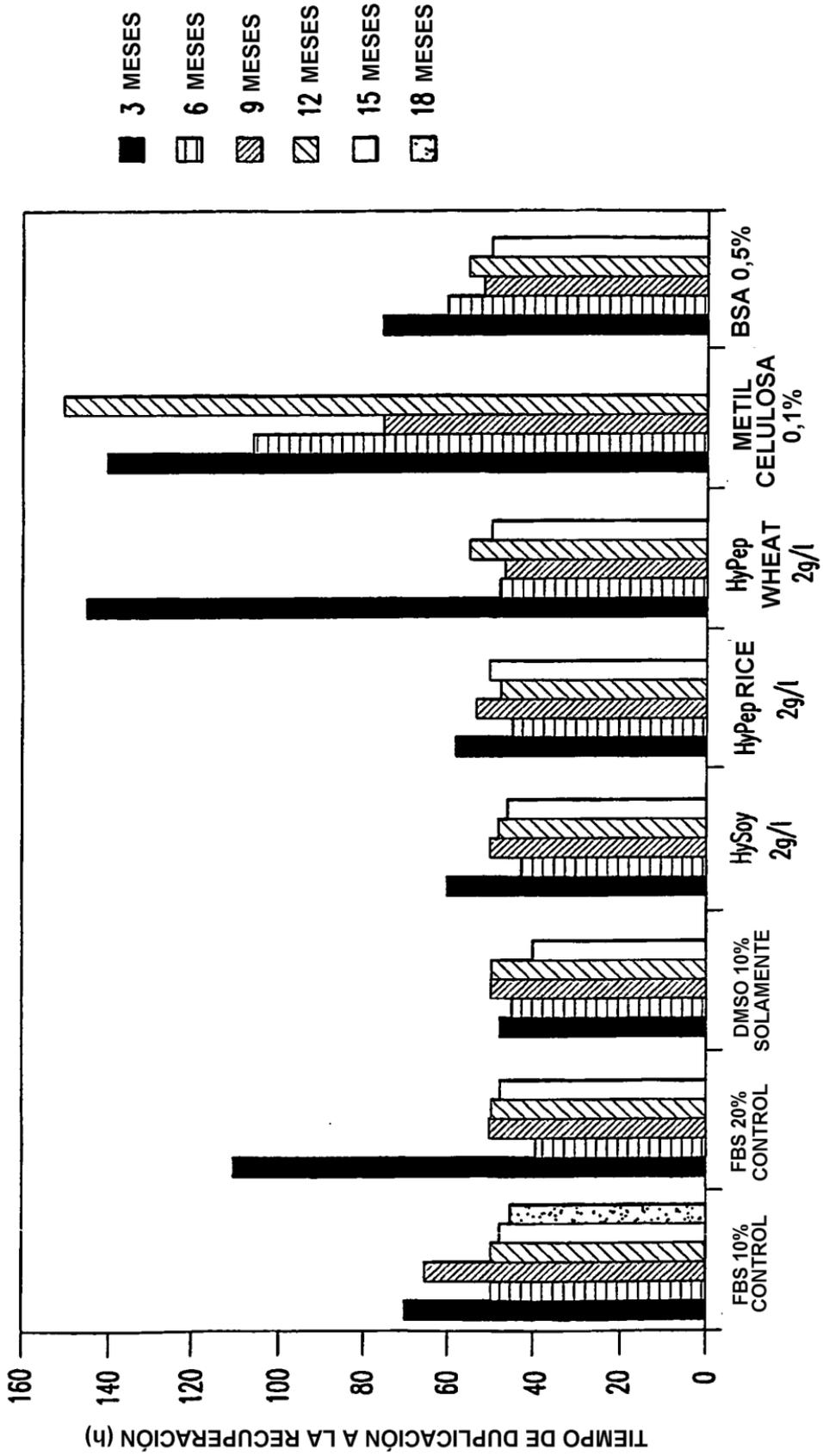


FIG.3

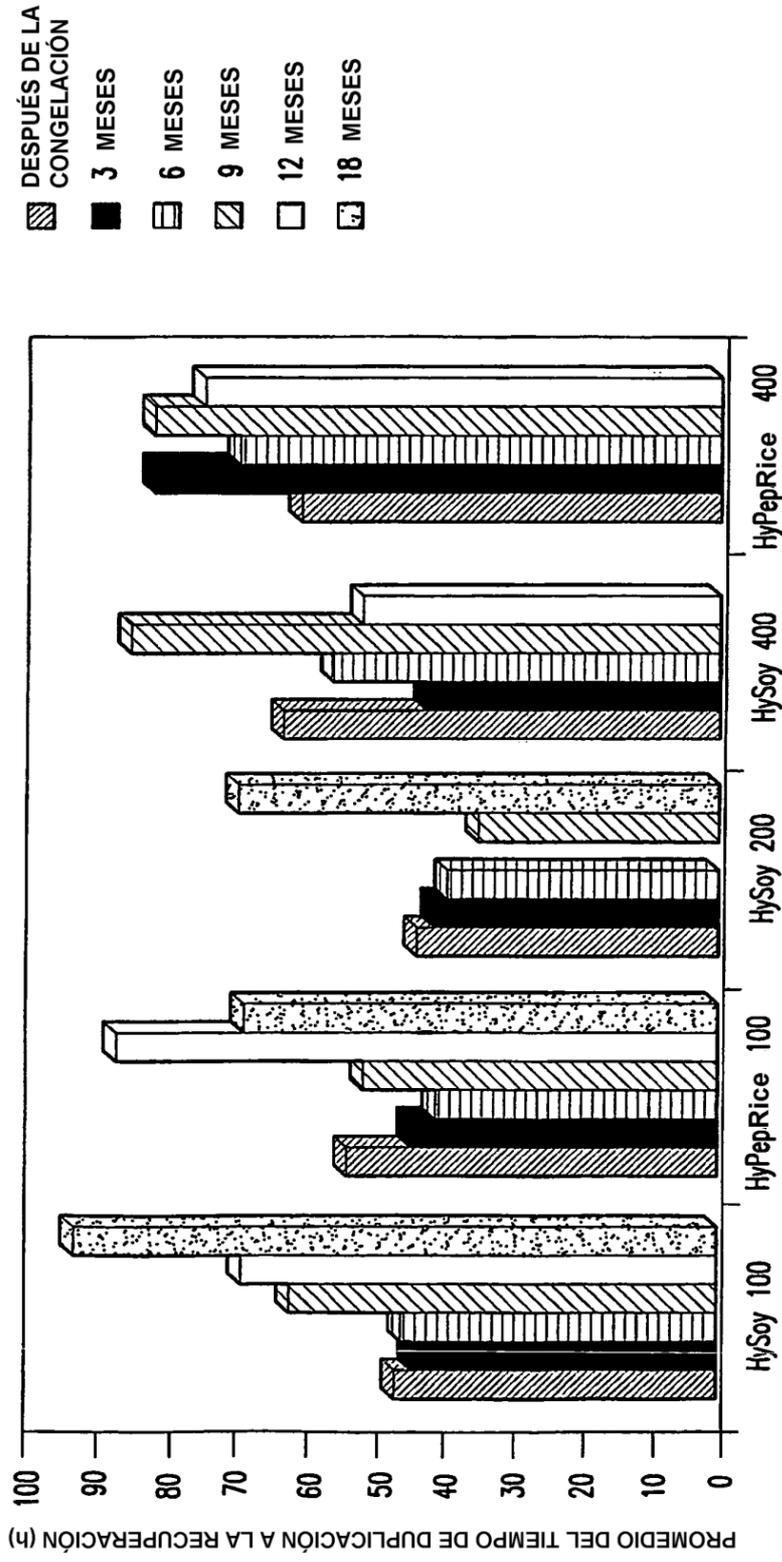


FIG.4

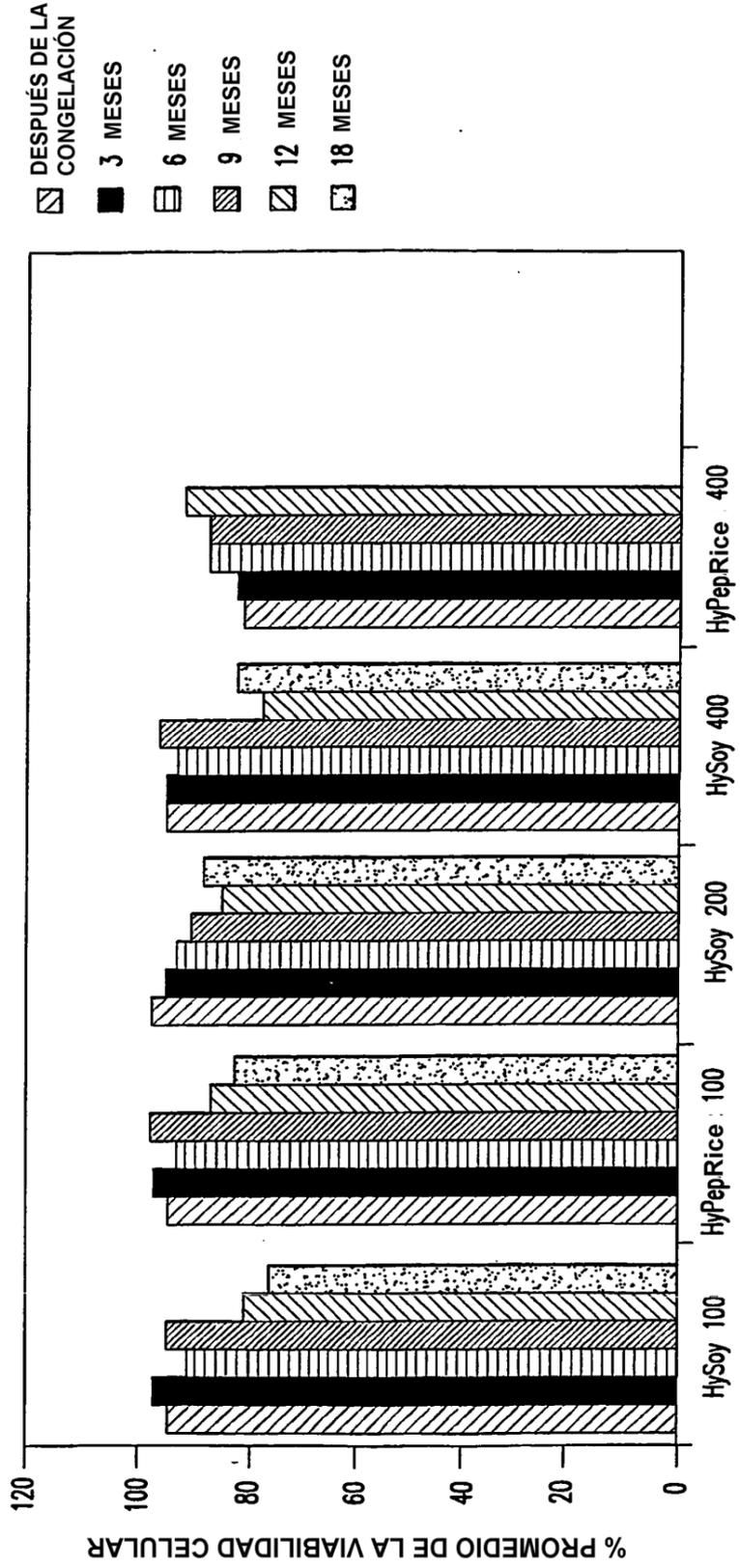


FIG.5