(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 317**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **10004393 .4**
(96) Fecha de presentación: **12.10.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2213725**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

(54) Título: **Medio exento de proteínas animales para el cultivo de células**

(30) Prioridad:

29.10.2004 US 976399

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

20.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

20.12.2012

(73) Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

(72) Inventor/es:

GRILLBERGER, LEOPOLD;
REITER, MANFRED;
MUNDT, WOLFGANG y
DORNER, FRIEDRICH

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 393 317 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

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras. La invención también se refiere a procesos de cultivo exentos de proteínas animales, en los que las células pueden ser cultivadas, propagadas y pasadas sin añadir proteínas animales complementarias al medio de cultivo. Estos procesos son útiles para cultivar células, tales como células recombinantes o células infectadas con un virus, y para producir productos biológicos mediante procesos de cultivo celular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Para el cultivo de células, particularmente de células eucariotas, y más específicamente células de mamífero, existe una necesidad constante de usar medios de cultivo especiales que hacen disponibles las sustancias nutrientes de crecimiento que son necesarias para un crecimiento eficaz de las células y para la producción de las proteínas o de los virus que se desean. Para la producción eficaz de productos biológicos, tales como virus o proteínas recombinantes, es importante que se alcance una densidad celular óptima, así como que se aumente la propia expresión de proteínas para obtener un rendimiento máximo del producto.

Las formulaciones de medios de cultivos celulares se han complementado con diversos aditivos, que incluyen componentes no definidos tales como suero bovino fetal (*fetal calf serum*, FCS), diversas proteínas derivadas de animales y/o hidrolizados de proteínas de origen bovino.

En general, el suero o las sustancias derivadas del suero, tales como la albúmina, la transferrina o la insulina, pueden contener agentes no deseados que pueden contaminar los cultivos celulares y los productos biológicos obtenidos a partir de los mismos. Adicionalmente, los aditivos derivados de suero humano deben ser ensayados para comprobar todos los virus conocidos, incluyendo hepatitis y VIH, que pueden ser transmitidos por el suero. Además, el suero bovino y los productos derivados del mismo son portadores de un riesgo de contaminación por BSE. Además, todo los productos derivados de suero pueden estar contaminados por constituyentes desconocidos. En el caso del suero o de aditivos proteicos que derivan de seres humanos o de otras fuentes animales en cultivos celulares, existen numerosos problemas (por ejemplo, la calidad variable de la composición de los diferentes lotes y el riesgo de contaminación por micoplasma, virus o BSE), particularmente si las células se usan para la producción de fármacos o de vacunas para su administración a seres humanos.

Por lo tanto, se han realizado muchos intentos para proporcionar sistemas hospedadores y condiciones de cultivo eficaces que no requieran suero ni otros compuestos proteicos animales. El medio simple exento de suero incluye típicamente medio basal, vitaminas, aminoácidos o sales orgánicas o inorgánicas, y opcionalmente componentes adicionales para hacer el medio nutricionalmente complejo.

Se sabe que los hidrolizados de soja son útiles para los procesos de fermentación y pueden mejorar el crecimiento de muchos organismos de cultivo difícil, levaduras y hongos. El documento WO 96/26266 describe que los digeridos papaicos de harina de soja son una fuente de carbohidratos y de nitrógeno y muchos de los componentes pueden usarse en un cultivo tisular. Franek y col. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688 – 692) describen los efectos promotores del crecimiento y de la productividad de fracciones peptídicas definidas del hidrolizado de soja.

El documento WO 96/15231 desvela un medio exento de suero formado por medio sintético mínimo esencial y extracto de levadura para la propagación de células de vertebrados y procesos de producción de virus. En el documento WO 98/15614. Se desvela una formulación de medio compuesta por medio de un cultivo de células basal que comprende un péptido de arroz y un extracto de levadura, y la digestión enzimática de los mismos, y/o un lípido vegetal para el crecimiento. En el documento WO 01/23527 se desvela un medio que comprende un hidrolizado de soja purificado para el cultivo de células recombinantes. El documento WO 00/03000 desvela un medio que comprende un hidrolizado de soja y un extracto de levadura, pero también requiere la presencia de formas recombinantes de proteínas animales, tales como factores de crecimiento.

El documento WO2004/005493 describe un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende una combinación de péptidos no derivados de animales procedentes de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura animal. El documento WO01/11021 se refiere a un clon celular recombinante estable que es estable en un medio que no contiene suero y proteínas durante al menos 40 generaciones. El documento FR72.29396 describe un medio de cultivo para la selección de bacterias en el que el medio está exento de proteínas animales. El documento WO02/24876 se refiere a un proceso para aislar virus procedentes de varias fuentes y para producir vacunas antigripales de virus vivos atenuados en un cultivo celular Vero exento de suero en unas condiciones en las que se minimizan o se evitan alteraciones en los antígenos de superficie del virus debido a la selección adaptativa.

El documento EP-A-0 481 791 describe un medio de cultivo bioquímicamente definido para cultivar células CHO modificadas genéticamente que está exento de proteínas, lípidos y carbohidratos aislados a partir de una fuente animal, que comprende además una insulina recombinante o un análogo de insulina, del 1 % al 0,025 % p/v de digerido de papaína de peptona de soja y putrescina. El documento WO 98/08934 describe un cultivo celular eucariota exento de suero que comprende péptidos de hidrolizado de soja (1 – 1000 mg/L), de 0,01 a 1 mg/L de putrescina y varios componentes derivados de animales, incluyendo albúmina, fetuína, varias hormonas y otras proteínas. En este contexto, también debería mencionarse que también se sabe que la putrescina está contenida en medios estándar tales como DMEM/Ham's F12 a una concentración de 0,08 mg/L.

Sin embargo, los medios conocidos en el estado de la técnica son a menudo nutricionalmente insuficientes y/o deben ser complementados con complementos proteicos derivados de animales o versiones recombinantes de proteínas, tales como insulina, factor de crecimiento insulinoide u otros factores de crecimiento.

Por lo tanto, existe una necesidad actual de aumentar el rendimiento de la proteína recombinante expresada o de cualquier otro producto de expresión, y de la tasa de crecimiento específica de las células, y de proporcionar un medio de cultivo celular óptimo completamente exento de proteínas animales para la producción de productos biológicos, tales como los usados como productos farmacéuticos o como vacunas en seres humanos.

Sobre la base de extractos de peptona de soja (también denominado "hidrolizados de soja") se han desarrollado medios que no contienen proteínas animales. Sin embargo, la calidad de los lotes disponibles comercialmente de hidrolizados de soja varía extremadamente y, como resultado, existen amplias variaciones en la producción de proteínas recombinantes o de productos víricos (una variación de hasta en un factor de 3) en función de los lotes de hidrolizado de soja usados ("variación interlote"). Este inconveniente afecta a la proliferación de las células, así como a la expresión proteica de cada célula.

Por lo tanto, hay una necesidad de un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que esté completamente exento de proteínas animales y supere al menos uno de los problemas mencionados anteriormente.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que no contenga ninguna proteína complementaria añadida derivada de una fuente animal ni/o proteínas animales recombinantes, que permita un crecimiento celular eficaz y en particular la producción proteica, con una calidad continua con respecto a la cantidad de expresión por célula. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para cultivar células y un procedimiento para la expresión eficaz de proteínas recombinantes que están exentas de proteínas animales.

Otro objeto de la presente invención es reducir el hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras con objeto de superar los efectos inhibidores que impactarían negativamente sobre el rendimiento de la producción de un producto recombinante o vírico deseado. Sorprendentemente se encontró que los hidrolizados eran la causa de las variaciones interlote en la producción.

El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la invención comprende al menos una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras, en el que la poliamina se origina preferiblemente a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

Sorprendentemente, la adición de al menos una poliamina, en particular la adición de putrescina, al medio de cultivo celular exento de proteínas animales, proporciona el efecto ventajoso no sólo de promocionar el crecimiento celular, sino en particular de aumentar la expresión de proteínas por célula, y en particular, la expresión de proteínas recombinantes por célula.

Además, el medio exento de proteínas animales según la presente invención proporciona un crecimiento celular uniforme y un aumento en el rendimiento de los productos deseados, particularmente de proteínas objetivo tales como proteínas recombinantes, independientemente de la calidad o de las variaciones del lote del hidrolizado de proteínas, en particular de los hidrolizados vegetales, en el medio de cultivo celular exento de proteínas animales. La complementación específica de un medio de cultivo celular con poliaminas y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras actúa sinérgicamente para aumentar el crecimiento celular, la productividad específica celular y la densidad celular final.

Por lo tanto, el medio exento de proteínas animales según la presente invención es más favorable para la expresión de proteínas recombinantes y la tasa de crecimiento celular en comparación con los medios conocidos en la materia. Adicionalmente, el medio exento de proteínas animales según la presente invención permite la reducción de la cantidad de hidrolizado de proteínas que se debe añadir a un volumen dado del medio de cultivo celular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una gráfica que compara (A) la productividad volumétrica de FVIII-CoA (expresada en [U/L/D] = unidades de FVIII COA por L de volumen de reactor por día y (B) la tasa de crecimiento específica (μ expresada en [d^{-1}] = 1 por día) de células GD8/6 en función del medio usado para el cultivo, que fueron complementadas con diferentes lotes (K119-1, K138-1, M022963, M024423, M022453) de hidrolizados de soja (0,4 % (p/v)).

La Figura 2 muestra una tabla que compara la productividad volumétrica de FVIII-CoA de células GD8/6 crecidas en medios con diferentes concentraciones de hidrolizado de soja.

La Figura 3 muestra una tabla que compara la productividad volumétrica de FVIII-CoA de células GD8/6 en función del medio usado para el cultivo, que fueron complementados con diferentes lotes (K119-1, K138-1, M022963, M024423, M022453) de hidrolizados de soja (0,25 % (p/v)) (A) en ausencia de putrescina, y (B) en presencia de 1 mg/L de putrescina · 2 HCl.

La Figura 4 muestra una gráfica que compara las tasas de crecimiento específicas de células GD8/6 en función del medio usado para el cultivo, que fueron complementados con 5 lotes diferentes (K119-1, K138-1, M022963, M024423, M022453) de hidrolizados de soja (0,25 % (p/v)) (A) en ausencia de putrescina, y (B) en presencia de 1 mg/L de putrescina · 2 HCl.

La Figura 5 muestra una tabla que compara la productividad volumétrica de FVIII-CoA (QP [U/L/D]) y la tasa de crecimiento específica (μ [d^{-1}]) de células GD8/6 y su desviación estándar crecidas en medio con 5 lotes diferentes seleccionados (K119-1, K138-1, M022963, M024423, M022453) de hidrolizados de soja (0,4 % (p/v) o 0,25 % (p/v)) con los mismos hidrolizados de soja (0,25 % (p/v)) con y sin putrescina · 2 HCl a 1 mg/L.

La Figura 6 muestra una tabla que describe las concentraciones medias de putrescina encontradas en hidrolizados de soja (0,4 % (p/v) en medio de cultivo celular) procedentes de diferentes fabricantes.

La Figura 7 muestra una tabla que compara el efecto del hidrolizado de soja ((0,4 % (p/v)) y del hidrolizado de soja (0,25 % (p/v)) + 1,8 mg/L de putrescina · 2 HCl sobre la productividad volumétrica (QP expresada en [mg IgG1/L de volumen del reactor/día] y la productividad específica celular (qp [μg IgG1/células 10E06/d]) en células ARH77 que secretan un anticuerpo monoclonal.

La Figura 8 muestra una gráfica que compara el efecto del hidrolizado de soja (0,25 % (p/v)) y del hidrolizado de soja (0,25 % (p/v)) + 1 mg/L de putrescina (1,8 mg/L de putrescina · 2 HCl) sobre la productividad específica celular de eritropoyetina (EPO) de células BHK recombinantes (producción de EPO (unidades) / consumo de glucosa (g).

La Figura 9 muestra una tabla que compara el efecto de la putrescina, la ornitina y la espermina sobre un amplio intervalo de concentraciones (0 – 18 mg/L) sobre el crecimiento específico (μ, absoluto, μ relativo) y la productividad celular específica (Qp absoluta, Qp relativa) de células GD8/6 cultivadas en medio BAV que contiene un 0,0 % de hidrolizado de soja y ninguna amina, o en medio BAV que contiene una concentración reducida de hidrolizado de soja del 0,25 % complementada con poliaminas en el intervalo de concentraciones indicado anteriormente. BAV – SP al 0,25 % = medio BAV que contiene un 0,25 % de hidrolizado de soja; BAV – SP al 0,4 % = medio BAV que contiene un 0,4 % de hidrolizado de soja; BAV sin soja ni poliaminas = medio BAV que no contiene ni hidrolizado de soja ni poliaminas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se establece en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende al menos una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras, en una concentración lo suficientemente reducida con objeto de evitar los potenciales efectos inhibidores del hidrolizado.

El término "poliamina" se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos formados por carbono, nitrógeno e hidrógeno, y que contienen dos o más grupos amino. Por ejemplo, el término engloba moléculas elegidas del grupo formado por cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina y ornitina.

Salvo que se indique de otro modo, los valores de concentración indicados a lo largo de este documento se refieren a la forma de base libre del (los) componente(s).

En el medio de cultivo celular exento de proteínas animales descrito en este documento, la concentración de la poliamina está presente en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 30 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/l hasta aproximadamente 20 mg/L, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 10 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 2 mg/L hasta aproximadamente 8 mg/L, muy preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5 mg/L en el medio.

La concentración total del hidrolizado de proteínas derivadas de vegetales y/o levaduras en el medio de cultivo celular exento de proteínas animales descrito en este documento es de aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 5 % (p/v), más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 2 % (p/v), más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), muy preferiblemente de aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente que el 0,25 % (p/v); es decir, si el medio contiene un hidrolizado de proteínas derivado de vegetales y de levaduras, la concentración total se calcula sumando los valores de concentración de cada uno de los componentes del hidrolizados de proteínas contenido en el medio.

El término "medio de cultivo celular exento de proteínas animales" según la presente invención se refiere a un medio que no contiene proteínas ni/o componentes proteicos procedentes de eucariotas pluricelulares no vegetales. Las proteínas típicas que se evitan son las que se encuentran en el suero y en sustancias derivadas del suero, tales como albúmina, transferrina, insulina y otros factores de crecimiento. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales también está exento de cualquier producto purificado derivado de animales y de productos derivados de animales recombinantes, así como de digeridos proteicos y extractos de los mismos o de extractos lipídicos o componentes purificados de los mismos. Las proteínas animales y los componentes proteicos deben distinguirse de las proteínas no animales, pequeños péptidos y oligopéptidos obtenibles a partir de plantas (habitualmente de 10 – 30 aminoácidos de longitud), tales como la semilla de soja, y de eucariotas inferiores, tales como levaduras, que pueden incluirse en el medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la invención.

El medio de cultivo exento de proteínas animales según la invención puede basarse en cualquier medio basal tal como DMEM, Ham's F12, medio 199, McCoy o RPMI conocidos generalmente por el trabajador experto. El medio basal puede comprender varios ingredientes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de carbohidratos, estando presente cada ingrediente en una cantidad que sustente el cultivo de una célula que generalmente es conocido por el experto en la materia. El medio puede contener sustancias auxiliares, tales como sustancias tamponantes como bicarbonato sódico, antioxidantes, estabilizantes para contrarrestar el estrés mecánico, o inhibidores de la proteasa. Si se requiere puede añadirse como agente antiespumante un tensioactivo no iónico, tal como mezclas de polietilenglicoles y propilenglicoles (por ejemplo, Pluronic F68 ®, SERVA).

La poliamina empleada para el medio de cultivo exento de proteínas animales según la invención puede elegirse del grupo formado por cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina y combinaciones

de las mismas. Muy preferiblemente, el medio de cultivo exento de proteínas animales contiene ornitina, putrescina y espermina.

En una forma de realización preferida del medio de cultivo exento de proteínas animales, la poliamina controla la síntesis de ADN y de ARN, la proliferación celular, la diferenciación celular, la estabilización de la membrana y/o la protección antioxidante del ADN. La putrescina, la espermidina, la espermina y la ornitina son ejemplos de poliaminas que muestran estas funciones. Otro ejemplo de una poliamina es la cadaverina.

En otra forma de realización preferida del medio de cultivo exento de proteínas animales, la poliamina se origina a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

En el medio de cultivo celular exento de proteínas animales según se describe en este documento, la poliamina está presente en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 30 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 20 mg/L, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 10 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 2 mg/L hasta aproximadamente 8 mg/L, muy preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5 mg/L en el medio, y el hidrolizado de proteínas derivado de plantas y/o de levaduras que está presente en el medio en una concentración que varía desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 5 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 2 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), muy preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,25 % (p/v).

El hidrolizado de proteínas derivado de vegetales usado para el medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la invención se elige preferiblemente del grupo formado por un hidrolizado de cereales y/o un hidrolizado de soja. El hidrolizado de soja puede ser un hidrolizado de soja altamente purificado, un hidrolizado de soja purificado o un hidrolizado de soja en bruto.

El término "hidrolizado" incluye cualquier digerido enzimático de un extracto vegetal o de levadura. El "hidrolizado" puede ser adicionalmente digerido enzimáticamente, por ejemplo, mediante papaína, y/o formado mediante autolisis, termolisis y/o plasmolisis. Los hidrolizados que se van a usar según la presente invención también están disponibles comercialmente, tales como HyPep 1510®, Hy-Soy®, Hy-Yeast 412® y Hi-Yeast 444®, de fuentes tales como Quest International, Noruega, NY, OrganoTechnie, S.A. Francia, Deutsche Hefewerke GmbH, Alemania, o DMV Intl. Delhi, NY. Algunas fuentes de extractos de levadura y de hidrolizados de soja también se desvelan en los documentos WO 98/15614, WO 00/0300O, WO 01/23527 y US 5.741.705.

Los hidrolizados se purifican preferiblemente a partir de la fracción en bruto, ya que las impurezas podrían interferir con un cultivo eficaz. La purificación puede llevarse a cabo mediante ultrafiltración o con cromatografía de Sephadex, por ejemplo, con Sephadex 25 o Sephadex G10 o materiales equivalentes, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía en fase inversa. Las fracciones pueden contener hidrolizados con un peso molecular definido, preferiblemente de hasta aproximadamente 1000 Dalton, más preferiblemente de hasta aproximadamente 500 Dalton, muy preferiblemente de hasta aproximadamente 350 Dalton. Al menos aproximadamente el 90 % del hidrolizado tiene preferiblemente un peso molecular de hasta aproximadamente 1000 Dalton. El peso molecular medio de los hidrolizados está preferiblemente entre aproximadamente 220 y aproximadamente 375 Daltons. El valor del pH del hidrolizado debería estar en el intervalo de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7,5. El contenido total en nitrógeno está preferiblemente entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 15 %, y el contenido en cenizas es preferiblemente de hasta aproximadamente el 20 %. El contenido en aminoácidos libres está preferiblemente entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 30 %. El contenido en endotoxinas es preferiblemente menor de aproximadamente 500 U/g.

La invención también proporciona un procedimiento para usar al menos una poliamina para su adición a un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que contiene un hidrolizado de proteínas derivado de vegetales y/o de levaduras, para aumentar el rendimiento de la expresión de proteínas en las células cultivadas. La poliamina puede estar presente en el medio de cultivo descrito en este documento en una concentración total que varía desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 30 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 20 mg/L, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 mg/L hasta aproximadamente 10 mg/L, más preferiblemente desde aproximadamente 2 mg/L hasta aproximadamente 8 mg/L, muy preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5 mg/L en el medio. Preferiblemente, la poliamina se elige del grupo formado por cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, el hidrolizado de proteínas derivado de vegetales y/o de levaduras está presente en el medio en una concentración que varía desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 5 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 2 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), más preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), muy preferiblemente aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,25 % (p/v).

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para cultivar células, que comprende las etapas:

(a) proporcionar un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la invención, y

(b) propagar las células en el medio para formar un cultivo celular.

En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular exento de proteínas animales comprende al menos una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras. Preferiblemente, la poliamina se

origina a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

La presente invención no se limita a ningún tipo de célula. En una forma de realización preferida de la invención, las células usadas son, por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas, células de levadura. Las células pueden ser, por ejemplo, células madre o células recombinantes transformadas con un vector para la expresión génica recombinante, o células transfectadas con un virus para producir productos víricos. Las células también pueden ser, por ejemplo, células que producen una proteína de interés sin una transformación recombinante, por ejemplo, un linfocito B que produce un anticuerpo, que puede ser transformado a un estado inmortalizado, por ejemplo, mediante una infección vírica como la infección por el virus de Epstein Barr. Las células también pueden ser, por ejemplo, células primarias, por ejemplo, células embrionarias de pollo, o líneas celulares primarias. Se prefieren las células que se usan para la producción de virus *in vitro*. En una forma de realización preferida las células pueden ser células BSC, LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDGK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293, células RK y células embrionarias de pollo.

Las células que pueden usarse según la presente invención pueden cultivarse mediante un procedimiento elegido del grupo de cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático, todos los cuales generalmente son conocidos en la materia.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para expresar una proteína objetivo tal como una proteína heteróloga o autóloga, o una proteína recombinante, que comprende las etapas de:

a) hacer crecer un cultivo de células en un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la presente invención; e

b) introducir en las células una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia codificante para la proteína objetivo;

c) seleccionar las células portadoras de la secuencia de ácido nucleico; e

d) inducir selectivamente la expresión de la proteína objetivo en las células.

En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular exento de proteínas animales comprende al menos una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras. Preferiblemente, la poliamina se origina a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

La secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia codificante para la proteína objetivo puede ser un vector. El vector puede ser un virus o un plásmido. La secuencia codificante para una proteína objetivo puede ser un gen específico o una parte biológica funcional del mismo. En una forma de realización preferida, la proteína objetivo es al menos una parte biológicamente activa de un factor de coagulación sanguínea tal como el Factor VIII o al menos una parte biológicamente activa de una proteína implicada en la producción de eritrocitos y en la angiogénesis, tal como la eritropoyetina, o un anticuerpo monoclonal.

Preferiblemente, el ácido nucleico comprende adicionalmente otras secuencias adecuadas para la expresión controlada de una proteína objetivo, tales como secuencias promotoras, como potenciadores, cajas TATA, sitios de inicio de la transcripción, policonectores, sitios de restricción, secuencias de poli-A, secuencias de procesado de proteínas, marcadores de selección y similares, que son generalmente conocidas por el experto en la materia.

Son muy preferidas las siguientes líneas celulares transformadas con un vector recombinante para la expresión de los productos respectivos: células CHO para la producción del factor de coagulación recombinante VIII, células BHK para la producción de eritropoyetina recombinante, virus de Epstein Barr transformado, linfocitos B humanos inmortalizados para la producción de anticuerpos humanos.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para producir un virus o una parte de un virus, que comprende las etapas de:

a) hacer crecer un cultivo de células en un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la presente invención; e

b) infectar las células con un virus;

c) seleccionar las células infectadas por el virus; e

d) incubar las células para propagar el virus.

En una forma de realización preferida, el medio de cultivo celular exento de proteínas animales comprende al menos una poliamina y un hidrolizado derivado de vegetales y/o de levaduras. Preferiblemente, la poliamina se origina a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

El virus usado en el procedimiento según la invención puede ser cualquier virus patógeno, de mamífero, preferiblemente un virus humano, tal como una vacuna de un virus atenuado, por ejemplo, vacunas contra la viruela, coronavirus, preferiblemente virus del SARS, por ejemplo, para la producción de vacunas frente al SARS, ortomioxivirus, preferiblemente virus de la gripe, por ejemplo, para la producción de vacunas contra la gripe, paramixovirus, retrovirus, virus de la gripe A o B, virus de Ross River, flavivirus, preferiblemente virus del Nilo occidental o virus de la FSME (es decir, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas), por ejemplo, para la

producción de las respectivas vacunas, picornavirus, arenavirus, herpesvirus, poxvirus o adenovirus.

El virus puede ser un virus natural, un virus atenuado, un virus reagrupado o un virus recombinante o combinaciones de los mismos, por ejemplo, atenuado y recombinante. Además, en lugar de los actuales viriones que se están usando para infectar células con un virus, puede usarse un clon infeccioso de un ácido nucleico. También pueden usarse viriones escindidos.

El procedimiento para expresar una proteína o para producir un virus puede usarse para producir composiciones inmunógenas que comprenden un virus o un antígeno vírico.

Las células usadas para el procedimiento para producir un virus pueden elegirse del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura. Preferiblemente, las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

Las combinaciones preferidas de células con virus para producir un virus o una parte de un virus son célula Vero / vacuna atenuada, célula Vero / vacuna, célula Vero / Hepatitis A, célula Vero / virus de la gripe, célula Vero / virus del Nilo occidental, célula Vero / virus del SARS, células embrionarias de pollo / virus de la FSME.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para usar el medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la invención para cultivar células que expresan una proteína objetivo.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin estar limitada a los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 (medio BAV)

Se preparó un medio exento de proteínas animales con medio basal DMEM / HAM's F12 (1:1) complementado con sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes (Life technologies, 32500 Powder). También se añadieron L-glutamina (600 mg/L), ácido ascórbico (20 μM), etanolamina (25 μM), Synperonic® (SERVA) (0,25 g/L), selenito sódico (50 nM). Adicionalmente el medio de cultivo celular fue complementado con aminoácidos esenciales. Además se añadieron concentraciones variables de hidrolizado de soja (Quest Technologies, NY o DMV Intl., NY) en un intervalo del 0,0 – 1,0 % y concentraciones variables de poliaminas (0 – 10 mg/L) (Figuras 1 – 9)

Ejemplo 2

Se hicieron crecer cultivos celulares de células de mamífero recombinantes (por ejemplo, células CHO que expresan de forma estable el Factor VIII = células GD8/6) en suspensión en un cultivo quimioestático en biorreactores de 10 L. Las condiciones de cultivo de 37 °C, saturación de oxígeno del 20 % y pH de 7,0 a 7,1 se mantuvieron constantes. Los cultivos se complementaron con un suministro constante de medio BAV según se define en el Ejemplo 1 complementado adicionalmente con hidrolizados de soja en el intervalo del 0,1 – 1,0 % y/o la adición de putrescina · 2 HCl en el intervalo de 0-1 mg/L (cotéjese la Figura 1 – 5),

Se llevaron a cabo experimentos a pequeña escala con células GD8/6 en cultivo de suspensión en matraces de agitación Techne a un volumen de trabajo de 200 ml en modo de reabastecimiento de lote a 37 °C, sin control del pH ni de la pO2. Los cultivos se complementaron con medio BAV según se define en el Ejemplo 1 sin el complemento de hidrolizado de soja ni poliaminas, o complementado con hidrolizado de soja en el intervalo del 0,1 – 0,4 % y/o putrescina · 2 HCl, ornitina · HCL, espermina · 4 HCl en el intervalo de 0 – 18 mg/L (equivalente a 0 – 10 mg/L de la poliamina sin HCl (cotéjese la Figura 9).

Ejemplo 3 (cotéjense las Figuras 1 a 5 7, y 9)

Se determinaron los recuentos celulares a partir de las células en suspensión o de las células inmovilizadas mediante el recuento con una cámara de recuento CASY® según describen Scharfe y col., (Biotechnologie en Labor Praxis 10: 1096 – 1103 (1988)) o mediante extracción con ácido cítrico y tinción fluorescente de los núcleos, seguido por un recuento con un NodeoCounter ® (Chemometec, DK). La tasa de crecimiento específica (μ) se calcula a partir del incremento de las densidades celulares (X_t) y/o la tasa de dilución (D) del estado estacionario de los cultivos quimioestáticos de las suspensiones de células a lo largo de un determinado intervalo de tiempo (t):

$$\mu = D + \ln (Xt/X0) / t$$

Ejemplo 4

Se midió la actividad del Factor VIII (FVIII) (cotéjense las Figuras 1 a 5 y 9) mediante un ensayo cromogénico (Chromogenic, Suecia). La actividad de la eritropoyetina (cotéjese la Figura 8) y el título de anticuerpos monoclonales (cotéjese la Figura 7) se midieron mediante sistemas de ensayo ELISA.

La productividad volumétrica se calcula a partir de la cantidad de unidades de actividad o de títulos de antígeno rendidos por litro de volumen de reactor por día (U/L/d o mg/L/d) en los respectivos sistemas de producción.

La productividad específica celular se define como la cantidad específica de proteína producida (U o μg) por número de células por día (cotéjense las Figuras 7 y 9) o como la cantidad específica de proteína producida (U) producida por cantidad de D-glucosa consumida por las células (cotéjese la Figura 8).

Ejemplo 5

Se suministraron células GD8/6 con medio BAV que contenía un 0,4 % (p/v) de diferentes lotes de hidrolizado de soja. La productividad volumétrica del FVIII varió desde aproximadamente 600 hasta 1800 U/L/d, y las tasas de crecimiento específicas variaron desde 0,35 hasta 0,52 μ[d-1] entre los diferentes lotes (cotéjese la Figura 1). Esto indica que los lotes de hidrolizado de soja a la concentración del 0,4 % no permiten un crecimiento uniforme de las células GD8/6, posiblemente debido a la sustancias inhibidoras que afectan a la tasa de crecimiento específica (μ) que están contenidas en los hidrolizados de soja.

Ejemplo 6

Se suministraron células GD8/6 con medio BAV que contenía diferentes concentraciones del lote del hidrolizado de soja M022257 (en el intervalo de 0,15 – 1,0 % p/v). La productividad volumétrica del FVIII varió desde 500 hasta 1,100 U/L/d y alcanzó una productividad óptima de 1,100 U/L/d a una concentración de hidrolizado de soja del 0,4 % (p/v) (cotéjese la Figura 2).

Ejemplo 7

Se suministraron células GD8/6 con medio BAV que contenía un 0,25 % (p/v) de los mismos 5 lotes diferentes de hidrolizado de soja descritos en el Ejemplo 5 (Figuras 3A y 4A) y un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja de los mismos lotes de hidrolizado de soja complementados adicionalmente con 1 mg/L de putrescina · 2 HCl (Figuras 3B y 4B), respectivamente. La productividad volumétrica del FVIII varió desde 1700 U/L/d hasta 500 U/L/d en las células crecidas en medio BAV-SP que contenía un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja de diferentes lotes de hidrolizado de soja (Figura 3A). La tasa de crecimiento específica variaba desde 0,58 hasta 0,24 μ[d-1], lo que indicaba que la reducción en la concentración del hidrolizado de soja no conduce a una mejor o más constante tasa de crecimiento de las células (Figura 4A).

Por el contrario, únicamente se observaron variaciones menores en la productividad volumétrica del FVIII (Figura 3B) y en las tasas de crecimiento específicas (Figura 4B) entre los mismos lotes de hidrolizado de soja en las células crecidas en medio BAV que contiene un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja cuando se complementaba con 1 mg/L de putrescina · 2 HCl. La adición de 1 mg/L de putrescina · 2 HCl compensa aproximadamente la reducción de esta poliamina mediante la reducción en la concentración del hidrolizado de soja desde el 0,4 % (p/v) hasta el 0,25 % (p/v). A partir de esto puede concluirse que no es la concentración de la propia poliamina sino la adición de la poliamina en combinación con la reducción de las concentraciones de hidrolizado de soja lo que conduce a una reducción de las sustancias inhibidoras que reducen el crecimiento y la productividad (véase el Ejemplo 5). Adicionalmente, la adición de putrescina también conduce a un aumento mayor que proporcional en la productividad volumétrica del FVIII debido a un aumento en la productividad específica celular del FVIII (Figura 5).

Por lo tanto, la adición de putrescina a un medio de cultivo celular exento de proteínas animales no sólo promueve la tasa de expresión proteica de las células cultivadas, sino que también reduce la cantidad de hidrolizado vegetal que debe incluirse en el medio de cultivo con objeto de obtener el mismo crecimiento celular. Como resultado, el medio de cultivo se ve menos afectado por la variación interlote en la calidad del hidrolizado vegetal, y por lo tanto se consigue una mejora global en las condiciones de cultivo celular.

Ejemplo 8

La Figura 5 comprende el análisis estadístico de los Ejemplos mostrados en las Figuras 1, 2 y 4: las células GD8/6 se complementaron con medio BAV que contenía un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de soja o un 0,25 % (p/v) o un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja y 1 mg/L de putrescina · 2 HCl. Las desviaciones estándar se calculan basándose en cinco lotes seleccionados de hidrolizados de soja (K119-1, K138-1, M022963, MD24423, M022453). La productividad volumétrica y específica celular del FVIII y la tasa de crecimiento específica con un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja era menor que con un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de soja, lo que confirma el óptimo representado en la Figura 2. Sin embargo, la productividad volumétrica y específica celular del FVIII y la tasa de crecimiento específica aumenta en el medio de cultivo celular que contiene un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja + 1 mg/L de putrescina · 2 HCl. Además, la desviación estándar calculada a partir de cinco lotes diferentes de hidrolizados de soja está significativamente reducida (cotéjese la Figura 5 [QP [U/L/D] = productividad volumétrica; qp [mU/106 células/día] = productividad específica celular),

Ejemplo 9

Los Ejemplos 7 y 8 muestran que la putrescina es un compuesto activo que sustenta el crecimiento celular, y más específicamente, la expresión de proteínas. Por lo tanto, se analizó cuantitativamente la concentración de putrescina procedente de diferentes lotes de hidrolizado de soja de 2 proveedores diferentes (Quest y DMV) mediante un método por HPLC y se evaluó estadísticamente. La concentración en los medios de cultivo celular preparados con el hidrolizado de soja de ambos proveedores fue de aproximadamente 2,3 mg/L de putrescina, cuando se añadía hidrolizado de soja al medio a una concentración del 0,4 % (p/v) (cotéjese la Figura 6).

Ejemplo 10

Se hicieron crecer células ARH77 (línea celular linfoblastoide humana que expresa de forma estable hIgG) en un cultivo por perfusión tras la inmovilización sobre microportadores macroporosos en el tanque de un biorreactor de 80 L agitado a 37 °C, pH 7,0 – 7,2 y pO2 del 20 – 80 % de saturación de aire, abastecido con medio BAV que contiene un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de soja o un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja + 1,8 mg/L de putrescina · 2 HCl. Se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar a partir de los datos puntuales que representaban los estados estacionarios para las respectivas formulaciones de medio. La hIgG volumétrica-productividad volumétrica / productividad específica celular en medio BAV complementado con un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de soja era menor que el medio BAV complementado con un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja + 1,8

mg/L de putrescina · 2 HCl. Este experimento indica que la composición del medio según la presente invención es capaz de promover también la expresión de anticuerpos monoclonales a partir de una línea celular transformada. Además, la composición específica del medio también puede usarse en cultivos por perfusión (cotéjese la Figura 7).

Ejemplo 11

Se hicieron crecer hasta confluencia células BHK recombinantes en un medio que contenía suero bovino fetal al 5 % (v/v). Las células se lavaron con un medio exento de proteínas y se incubaron durante 3 días en medio BAV complementado con un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja o un 0,25 % (p/v) de hidrolizado de soja + 1,8 mg/L de putrescina · 2 HCl (Figura 8). Dado que en este experimento no se realizó ningún recuento celular, se midió la tasa de consumo de glucosa (g/L) durante tres días para probar la biomasa equivalente en el sistema de cultivo. La actividad de la EPO (mU/ml) se correlacionó con la tasa de consumo de glucosa (g/L) durante tres días. La adición de putrescina proporciona un aumento del 16 % en la productividad de EPO en comparación con un medio BAV complementado simplemente con un 0,25 % (p/v) de peptona de soja. Este experimento también indica que la composición del medio según la presente invención es capaz de promover la expresión de diferentes proteínas recombinantes.

Ejemplo 12

Para probar el efecto específico de la putrescina, la ornitina y la espermina en un amplio intervalo de concentraciones (de 0 – 18 mg/L equivalentes a 0-10 mg/L de la poliamina sin HCL) se lleva a cabo un experimento en el que las células GD8/6 se incubaron en matraces de agitación Techne a 1 – 1,5 E06 células / ml en medio BAV que contenía un 0,25 % y un 0,4 % de hidrolizado de soja sin poliaminas, y en medio BAV que contenía la reducida concentración de hidrolizado de soja del 0,25 % con las poliaminas en el intervalo de concentraciones mencionado anteriormente. Las tres poliaminas del intervalo de concentraciones investigado dieron como resultado un aumento significativo en la productividad específica celular (expresado en mU/106 células / día) en comparación con la formulación del medio no complementado con un 0,25 % de hidrolizado de soja, o la concentración aumentada del 0,4 %. El aumento en la productividad específica celular claramente no se correlaciona con un aumento en la tasa de crecimiento específica, lo que confirma el efecto específico sobre la tasa de expresión del FVIII recombinante de las células GD8/6 (Figura 9).

Por ejemplo, la presente descripción se refiere a los siguientes puntos:

1. Un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende al menos una poliamina y al menos un hidrolizado de proteínas derivado del grupo formado por vegetales y levaduras.

2. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10 mg/L.

3. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que la poliamina se elige del grupo formado por cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina y una combinación de las mismas.

4. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que la poliamina es putrescina en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10 mg/L, y el hidrolizado de proteínas es hidrolizado de soja en una concentración que varía desde aproximadamente el 0,05 % (p/v) hasta aproximadamente el 5 % (p/v)

5. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que la poliamina se origina a partir de una fuente distinta a un hidrolizado de proteínas.

6. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 hasta 30 mg/L.

7. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de proteínas está presente en el medio de cultivo en una concentración total que varía desde aproximadamente el 0,05 % (p/v) hasta aproximadamente el 5 % (p/v) para todos los hidrolizados de proteínas.

8. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de proteínas deriva de una planta elegida del grupo formado por cereales y soja.

9. Un procedimiento para cultivar células, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, y

(b) propagar las células en el medio para formar un cultivo celular.

10. El procedimiento según el punto 9, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

11. El procedimiento según el punto 9, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

12. Un procedimiento para expresar una proteína objetivo, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de células que se han hecho crecer en un medio de cultivo celular exento

de proteínas animales según el punto 1;

b) introducir en las células una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica para la proteína objetivo;

c) seleccionar las células portadoras de la secuencia de ácidos nucleicos; e

d) inducir selectivamente la expresión de la proteína objetivo en las células.

13. El procedimiento según el punto 12, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

14. El procedimiento según el punto 12 en el que la combinación de célula / proteína objetivo se elige del grupo formado por células CHO / factor de coagulación VIII, células BHK / eritropoyetina, virus de Epstein Barr transformado, linfocitos B humanos inmortalizados / anticuerpos humanos.

15. El procedimiento según el punto 12, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

16. Un procedimiento para producir un virus, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de células que se han hecho crecer en un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1;

b) infectar las células con el virus;

c) seleccionar las células infectadas por el virus; e

d) incubar las células para propagar el virus.

17. El procedimiento según el punto 16, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

18. El procedimiento según el punto 16, en el que la combinación de célula / virus se elige del grupo formado por célula Vero / vacuna atenuada, célula Vero / vacuna, célula Vero / Hepatitis A, célula Vero / virus de la gripe, célula Vero / virus del Nilo occidental, célula Vero / virus del SARS y células embrionarias de pollo / virus de la FSME.

19. El procedimiento según el punto 16, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende al menos una poliamina y al menos un hidrolizado de proteínas derivado del grupo formado por vegetales y levaduras, en el que la poliamina está presente en el medio de cultivo en una concentración que varía entre 2 y 5 mg/L y el hidrolizado de proteínas está presente en una concentración que varía desde el 0,05 % (p/v) hasta el 0,25 % (p/v).

2. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1, en el que la poliamina se elige del grupo formado por cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina y una combinación de las mismas.

3. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo contiene ornitina, putrescina y espermina.

4. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1, en el que la poliamina se origina a partir de una fuente distinta al hidrolizado de proteínas.

5. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1, en el que el hidrolizado de proteínas deriva de una planta elegida del grupo formado por cereales y soja.

6. Un procedimiento para cultivar células, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1, y

(b) propagar las células en el medio para formar un cultivo celular.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

8. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

9. Un procedimiento para expresar una proteína objetivo, que comprende las etapas de:

a) hacer crecer un cultivo de células en un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1;

b) introducir en las células una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica para la proteína objetivo;

c) seleccionar las células portadoras de la secuencia de ácidos nucleicos; e

d) inducir selectivamente la expresión de la proteína objetivo en las células.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

11. El procedimiento según la reivindicación 9 en el que la combinación de célula / proteína objetivo se elige del grupo formado por células CHO / factor de coagulación VIII, células BHK / eritropoyetina, virus de Epstein Barr transformado, linfocitos B humanos inmortalizados / anticuerpos humanos.

12. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

13. Un procedimiento para producir un virus, que comprende las etapas de:

a) hacer crecer un cultivo de células en un medio de cultivo celular exento de proteínas animales según la reivindicación 1;

b) infectar las células con el virus;

c) seleccionar las células infectadas por el virus; e

d) incubar las células para propagar el virus.

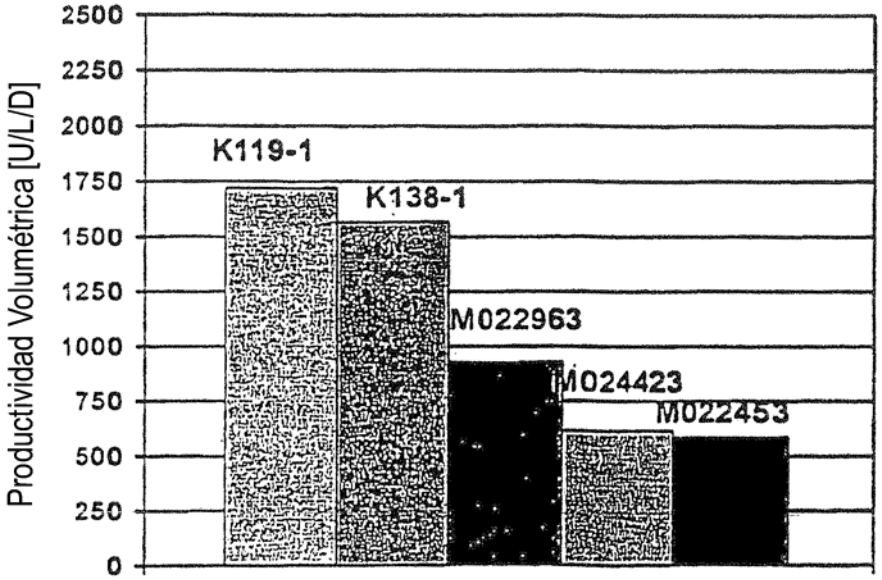
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que las células se eligen del grupo formado por células de mamífero, células de insecto, células de ave, células bacterianas y células de levadura.

15. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la combinación de célula / virus se elige del grupo formado por célula Vero / vacuna atenuada, célula Vero / vacuna, célula Vero / Hepatitis A, célula Vero / virus de la gripe, célula Vero / virus del Nilo occidental, célula Vero / virus del SARS y células embrionarias de pollo / virus de la FSME.

16. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que las células se cultivan mediante un procedimiento elegido del grupo formado por cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión y cultivo quimioestático.

Figura 1

A


Productividad Volumétrica [U/L/D]
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
K119-1
K138-1
M022963
M024423
M022453

B

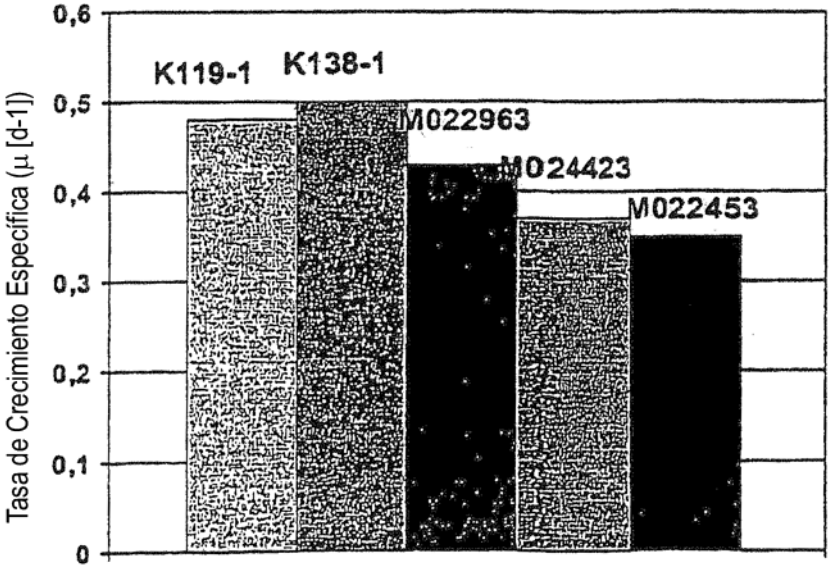
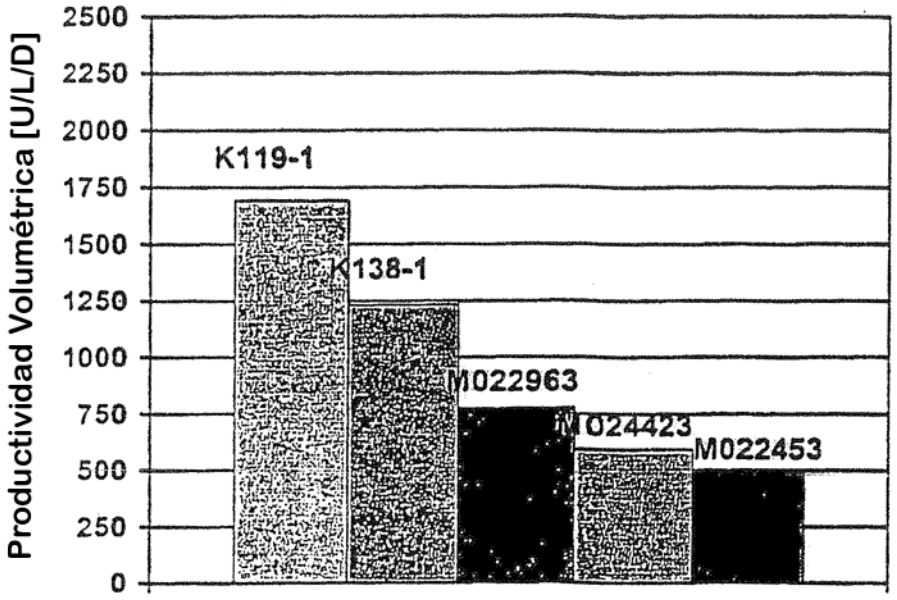

Tasa de Crecimiento Específica (μ [d-1])
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
K119-1
K138-1
M022963
M024423
M022453

Figura 2

Concentración de peptona de soja (%)	Productividad del FVIII [U/L/D]
0,15	500 - 600
0,25	900 – 1.000
0,40	1.000 – 1.1000
0,75	1.000 – 1.1000
1,00	500 - 600

Figura 3

A


Productividad Volumétrica [U/L/D]
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
K119-1
K138-1
M022963
M024423
M022453

B

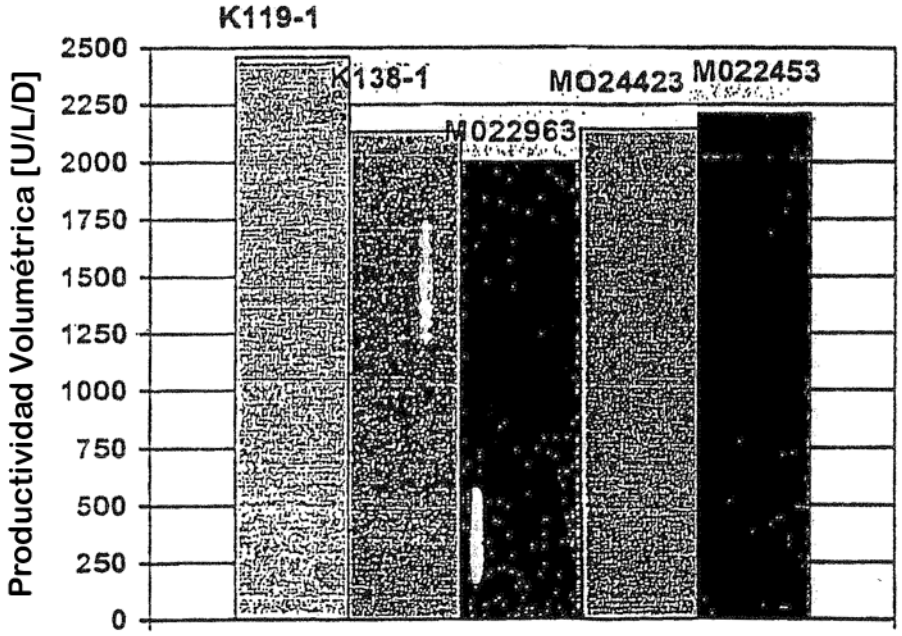
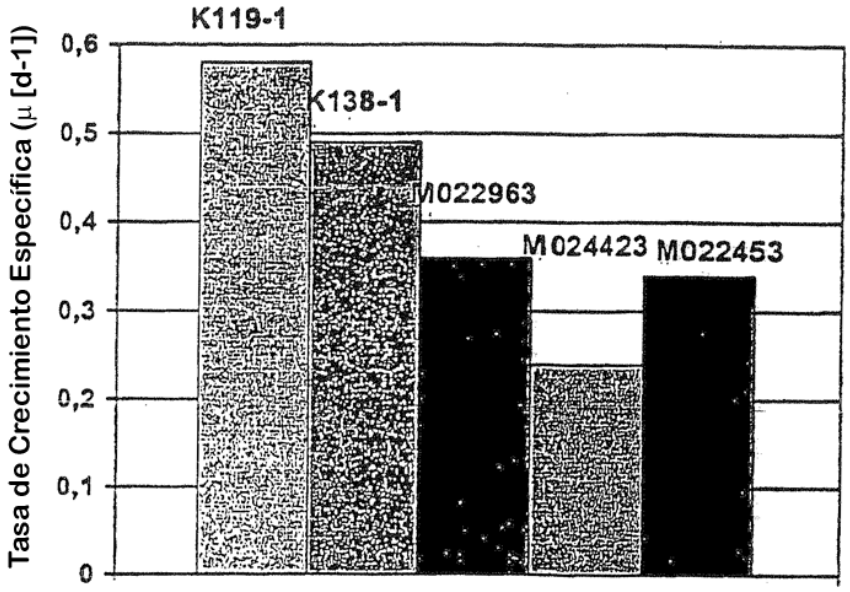

Productividad Volumétrica [U/L/D]
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
K119-1
K138-1
M022963
MO24423
M022453

Figura 4

A


K119-1
K138-1
M022963
M024423
M022453
Tasa de Crecimiento Específica (μ [d-1])
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0

B

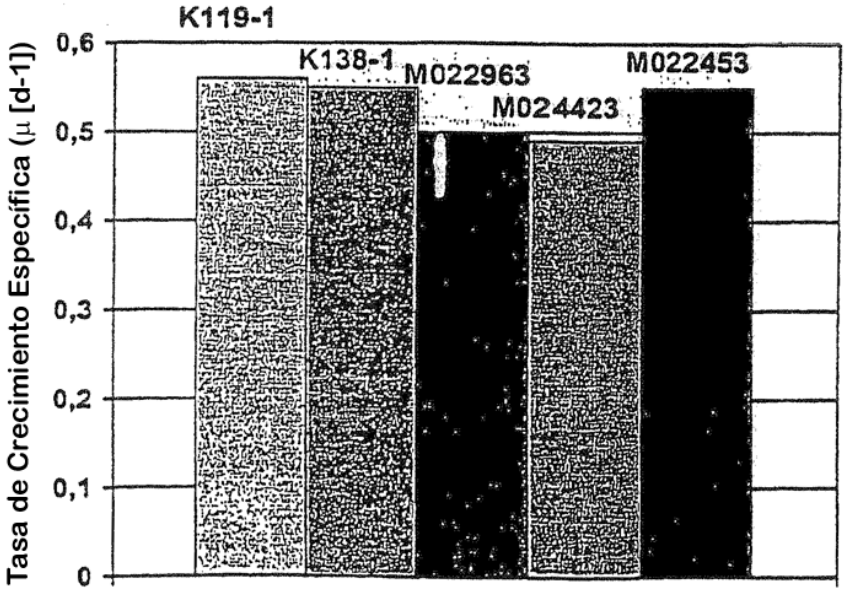

K119-1
K138-1
M022963
M024423
M022453
Tasa de Crecimiento Específica (μ [d-1])
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0

Figura 5

+/- Desviación Estándar de la Media	Hidrolizado de soja al 0,4%	Hidrolizado de soja al 0,25%	Hidrolizado de soja al 0,25% + 1 mg/mL de putrescina • 2 HCl
QP [U/L/D]	1083 +/- 531	959 +/- 497	2190 +/- 168
Qp [mU/ 10E06 cells / day]	813 +/- 381	631 +/- 251	1473 +/- 79
μ [d^{-1}]	0,43 +/- 0,07	0,40 +/- 0,13	0,53 +/- 0,03

Figura 6

	Putrescina [mg/mL]	Media de los lotes
Quest Hy Pep 1510 total	2,24	n= 20
DMV SE 50 MAF total	2,41	n= 6
Quest + DMV total	2,28	n= 26

Figura 7

+/- Desviación Estándar de la Media	Hidrolizado de soja al 0,4%	Hidrolizado de soja al 0,25% + 1,8 mg/mL de putrescina • 2 HCl
Productividad Volumétrica QP [mg/L/D]	12,2 +/- 1,6	18,5 +/- 3,5
Productividad específica celular qp [µg/10E06 células/día]	2,8 +/- 0,1	4,2 +/- 0,1

Figura 8

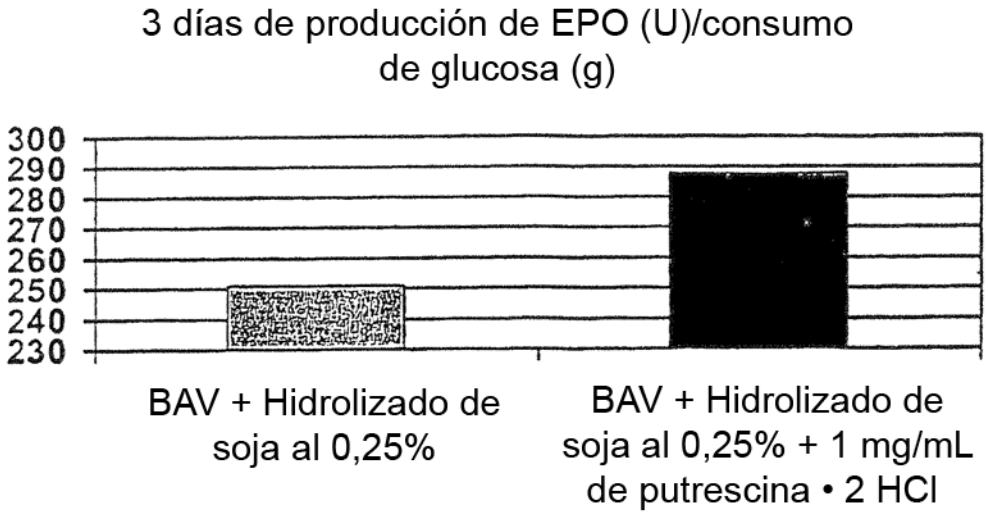

3 días de producción de EPO (U)/consumo de glucosa (g)
300
290
280
270
260
250
240
230
BAV + Hidrolizado de soja al 0,25%
BAV + Hidrolizado de soja al 0,25% + 1 mg/mL de putrescina • 2 HCl

Figura 9

	Qp absoluta [mU/10E06 células/día]	Qp relativa [%]	μ absoluta [d-1]	μ relativa [%]
BAV - SP al 0,25% sin aminas biógenas	504	100	0,359	100
BAV sin soja sin aminas biógenas	236	47	0,299	83
BAV - SP al 0,4% sin aminas biógenas	613	122	0,407	113
BAV - SP al 0,25% putrescina • 2 HCl, 3,6 mg/L	910	180	0,283	79
BAV - SP al 0,25% putrescina • 2 HCl, 18 mg/L	697	138	0,305	85
BAV - SP al 0,25% ornitina HCl, 2,5 mg/L	657	130	0,283	79
BAV - SP al 0,25% ornitina HCl, 12,5 mg/L	893	177	0,299	83
BAV - SP al 0,25% espermina 4 HCl, 3,4 mg/L	752	149	0,328	91
BAV - SP al 0,25% espermina 4 HCl, 117 mg/L	1034	205	0,372	104