

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 790**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.1998 E 10175914 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2281873**

54 Título: **Células en polvo seco y reactivos de cultivo celular y métodos para la producción de estos**

30 Prioridad:

14.02.1997 US 40314 P

12.09.1997 US 58716 P

16.10.1997 US 62192 P

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

31.10.2014

73 Titular/es:

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)

5791 Van Allen Way

Carlsbad, CA 92008, US

72 Inventor/es:

FIKE, RICHARD;

WHITFORD, WILLIAM y

BIDDLE, WILLIAM

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 516 790 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

Células en polvo seco y reactivos de cultivo celular y métodos para la producción de estos

CAMPO DE LA INVENCION

La descripción se refiere generalmente a formulaciones de células, medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores. Específicamente, la presente invención proporciona formulaciones de medio nutritivo en polvo seco, particularmente formulaciones de medio de cultivo celular, que comprenden todos los factores nutritivos necesarios que facilitan el cultivo *in vitro* de células, y los métodos de producción de estas formulaciones de medios. La invención se refiere además a métodos para producir suplementos de medios en polvo seco, tales como sueros en polvo seco (*por ejemplo*, suero fetal bovino). La invención se refiere además a formulaciones de amortiguador en polvo seco que producen condiciones iónicas y de pH particulares tras la rehidratación. La descripción se refiere además a métodos para producir células en polvo seco, tales como células procariotas (*por ejemplo*, bacterianas) y eucariotas (*por ejemplo*, fúngicas (especialmente de levadura), animales (especialmente de mamífero) y vegetales). La descripción se refiere a métodos para preparar formulaciones de medios nutritivos, suplementos de medios (particularmente sueros en polvo seco), subgrupos de medios y amortiguadores en polvo seco estériles. La invención se refiere además a formulaciones de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y de amortiguadores en polvo seco preparados mediante estos métodos. La presente invención se refiere además a estuches y métodos para el cultivo de células procariotas y eucariotas mediante el uso de estas formulaciones de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo seco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo celular proporcionan los nutrientes necesarios para mantener y cultivar las células en un medio ambiente controlado, artificial e *in vitro*. Las características y las composiciones de los medios de cultivo celular varían en dependencia de los requerimientos celulares particulares. Los parámetros importantes incluyen osmolalidad, pH, y formulaciones de nutrientes.

Las formulaciones de medios se han usado para cultivar una serie de tipos celulares que incluyen células animales, vegetales y bacterianas. Las células cultivadas en medios de cultivo catabolizan los nutrientes disponibles y producen sustancias biológicas útiles tales como anticuerpos monoclonales, hormonas, factores de crecimiento, virus y similares. Tales productos tienen aplicaciones terapéuticas y, con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, las células pueden modificarse mediante ingeniería genética para producir grandes cantidades de estos productos. Por lo tanto, la capacidad de cultivar células *in vitro* no solo es importante para el estudio de la fisiología celular, sino que además es necesaria para la producción de sustancias útiles que no pueden obtenerse de cualquier otra manera por medios rentables.

Las formulaciones de medios de cultivo celular están bien documentadas en la literatura y una serie de medios está disponible comercialmente. A inicios del trabajo en el cultivo celular, las formulaciones de medios se basaban en la composición química y en las propiedades físico-químicas de la sangre (*por ejemplo*, osmolalidad, pH, etc.) y se denominaban "soluciones fisiológicas" (Ringer, S., J. Physiol., 3:380-393 (1880); Waymouth, C., En: Cells and Tissues in Culture, Vol. 1, Academic Press, Londres, págs. 99-142 (1965); Waymouth, C., In Vitro 6:109-127 (1970)). Sin embargo, las células en diferentes tejidos del cuerpo de los mamíferos están expuestas a microambientes diferentes con respecto a la presión parcial de oxígeno/dióxido de carbono y las concentraciones de nutrientes, vitaminas, y elementos traza; en consecuencia, el cultivo *in vitro* exitoso de diferentes tipos celulares frecuentemente requerirá el uso de diferentes formulaciones de medios. Los componentes típicos de los medios de cultivo celular incluyen aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, metales traza, azúcares, lípidos y ácidos nucleicos, cuyos tipos y cantidades pueden variar en dependencia de los requerimientos particulares de un tipo de célula o de tejido dado. Frecuentemente, particularmente en composiciones de medios complejos, los problemas de estabilidad resultan en productos tóxicos y/o concentraciones eficaces más bajas de los nutrientes requeridos, lo que limita de esta manera la vida útil funcional de los medios de cultivo. Por ejemplo, la glutamina es un constituyente de casi todos los medios que se usan en el cultivo *in vitro* de células de mamífero. La glutamina se descompone espontáneamente en ácido pirrolidonacarboxílico y amoniaco. La velocidad de degradación puede estar influenciada por las condiciones iónicas y el pH pero en los medios de cultivo celular, la formación de estos productos de descomposición frecuentemente no puede evitarse (Tritsch y otros, Exp. Cell Res. 28:360-364(1962))

Wang y otros (In Vitro 14(8):715-722 (1978)) han demostrado que los fotoproductos tales como el peróxido de hidrógeno, que son letales para las células, se producen en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). La

riboflavina y el triptofano o la tirosina son componentes necesarios para la formación del peróxido de hidrógeno durante la exposición a la luz. Dado que la mayoría de los medios de cultivo de mamífero contienen riboflavina, tirosina y triptofano, los fotoproductos tóxicos deben producirse en la mayoría de los medios de cultivo celular.

5 Para evitar estos problemas, los investigadores prepararan los medios sobre una base "según sea necesario", y evitan el almacenamiento a largo plazo de los medios de cultivo. Los medios disponibles comercialmente, típicamente en forma de polvo seco, sirven como una alternativa conveniente para hacer los medios a partir de cero, es *decir*,
10 adicionando cada nutriente de forma individual, y además evitan algunos de los problemas de estabilidad asociados con los medios líquidos. Sin embargo, están disponibles sólo una serie limitada de medios de cultivo comerciales, excepto por aquellas formulaciones personalizadas suministradas por el fabricante.

Aunque las formulaciones de medios en polvo seco pueden aumentar la vida en estante de algunos medios, existe una serie de problemas asociados con los medios en polvo seco, especialmente en aplicaciones a gran escala. La producción de grandes volúmenes de medios requiere instalaciones de almacenamiento para los medios en polvo seco,
15 sin mencionar las cocinas de medios especializadas necesarias para mezclar y pesar los componentes nutrientes. Debido a la naturaleza corrosiva de los medios en polvo seco, los tanques de mezclado deben reemplazarse periódicamente.

Típicamente, las formulaciones de medios de cultivo celular están suplementadas con una variedad de aditivos, que incluyen componentes indefinidos tales como suero fetal bovino (FBS) (10-20% v/v) o extractos de embriones, órganos o glándulas de animales (0.5-10% v/v). Si bien el FBS es el suplemento más comúnmente aplicado en los medios de cultivo de células animales, de forma rutinaria se usan además otras fuentes de suero, que incluyen ternero recién nacido, caballo y humano. Los órganos o glándulas que se han usado para preparar extractos para la suplementación de medios de cultivo incluyen la glándula submaxilar (Cohen, S., J. Biol. Chem. 237:1555-1565 (1961)), la pituitaria (Peehl, D.M., y Ham, R.G., In Vitro 16:516-525 (1980); patente de los Estados Unidos núm. 4,673,649), el hipotálamo (Maciag, T., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5674-5678 (1979); Gilcrest, B.A., y otros, J Cell Physiol. 120:377-383 (1984)), retina ocular (Barretault, D., y otros, Differentiation 18:29-42 (1981)) y cerebro (Maciag, T., y otros, Science 211:1452-1454 (1981)). Estos tipos de suplementos químicamente indefinidos cumplen varias funciones útiles en los medios de cultivo celular (Lambert, K.J. y otros, En: Animal Cell Biotechnology, Vol. 1. Spier, R.E. y otros, Eds., Academic Press Nueva York, págs. 85-122 (1985)). Por ejemplo, estos suplementos proporcionan vehículos o quelantes para los nutrientes lábiles o insolubles en agua; unen y neutralizan porciones tóxicas; proporcionan hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasa y nutrientes esenciales de bajo peso molecular, frecuentemente indefinidos o sin identificar; y protegen a las células del estrés físico y de daños. Por lo tanto, el suero o los extractos de órgano/glándula se usan comúnmente como suplementos de costo relativamente bajo para proporcionar un medio de cultivo óptimo para
35 el cultivo de células animales.

Métodos de producción de medios de cultivo

Los medios de cultivo se producen típicamente en forma líquida o en forma de polvo. Cada una de estas formas tiene ventajas y desventajas particulares.
40

Por ejemplo, el medio de cultivo líquido tienen la ventaja de proporcionarse listo para el uso (a menos que sea necesaria la suplementación con nutrientes u otros componentes), y que las formulaciones se han optimizado para tipos celulares particulares. Los medios líquidos tienen, sin embargo, las desventajas de que frecuentemente requieren la adición de suplementos (*por ejemplo*, L-glutamina, suero, extractos, citocinas, lípidos, etc.) para un desempeño óptimo en el cultivo celular. Además, frecuentemente el medio líquido es difícil de esterilizar de forma económica, dado que muchos de los componentes son lábiles al calor (por lo tanto, se obvia el uso de la esterilización en autoclave, por ejemplo) y los líquidos a granel no son particularmente susceptibles a los métodos de esterilización penetrantes tales como irradiación gamma o ultravioleta; por lo tanto, los medios de cultivo líquidos se esterilizan más frecuentemente mediante filtración, que puede convertirse en un proceso caro y que consume tiempo. Además, la producción y el almacenamiento de grandes tamaños de lote (*por ejemplo*, 1000 litros o más) de medios de cultivo líquidos son poco prácticos, y los componentes de los medios de cultivo líquidos frecuentemente tienen vidas en estante relativamente cortas.
45

Para superar algunas de estas desventajas, el medio de cultivo líquido puede formularse en forma concentrada; estos componentes de medios pueden diluirse después a concentraciones de trabajo antes de usarse. Este enfoque proporciona la capacidad de preparar tamaños de lote más grandes y variables que con los medios de cultivo estándar, y las formulaciones de medios concentradas o componentes de estas frecuentemente tienen vidas en estante más largas (*ver* patente de los Estados Unidos núm. 5,474,931, que está dirigida a la tecnología para concentrar medios de cultivo). A pesar de estas ventajas, sin embargo, los medios líquidos concentrados aún tienen las desventajas de su necesidad de la adición de suplementos (*por ejemplo*, FBS, L-glutamina o extractos de órgano/glándula), y pueden ser
60 difíciles de esterilizar de forma económica.

- Como una alternativa a los medios líquidos, se usan frecuentemente los medios de cultivo en polvo. Los medios en polvo se producen típicamente al mezclar los componentes secos del medio de cultivo a través de un proceso de mezclado, por ejemplo, trituración en molino de bolas, o mediante la liofilización del medio de cultivo líquido preparado previamente. Este enfoque tiene las ventajas de que pueden producirse tamaños de lotes aún más grandes, los medios en polvo tienen típicamente vidas en estante más largas que los medios líquidos, y los medios pueden esterilizarse mediante irradiación (*por ejemplo*, irradiación gamma o ultravioleta) o permeación de óxido de etileno luego de la formulación. Sin embargo, los medios en polvo tienen varias desventajas distintas. Por ejemplo, algunos de los componentes de los medios en polvo se hacen insolubles o se agregan tras la liofilización de tal manera que la resolubilización es difícil o imposible. Además, los medios en polvo comprenden típicamente partículas finas de arenilla que pueden hacerlos particularmente difíciles de reconstituir sin alguna pérdida de material, y que adicionalmente pueden hacerlos poco prácticos para su uso en muchas instalaciones de producción biotecnológica que operan bajo el marco de GMP/GLP, USP o ISO 9000. Además, muchos de los suplementos usados en los medios de cultivo, *por ejemplo*, L-glutamina y FBS, no pueden adicionarse al medio de cultivo antes de la liofilización o trituración en molino de bolas debido a su inestabilidad o propensión a agregarse tras la concentración o debido a su sensibilidad al cizallamiento por procesos tales como trituración en molino de bolas. Finalmente, muchos de estos suplementos, particularmente los suplementos de suero tales como FBS, muestran una pérdida sustancial de la actividad o se vuelven completamente inactivos si se intenta producir suplementos en polvo mediante procesos tales como la liofilización.
- JP 2057175A describe un método para moldear el medio de cultivo en polvo en gránulos o tabletas. El método involucra atomizar 40-200mL de disolvente orgánico tal como metanol, etanol, propanol o butanol en 1kg de medio de cultivo en polvo y moldear la mezcla en gránulos de 0.5-2mm de diámetro y 1-5mm de longitud.
- Por lo tanto, existe una necesidad actual de disolver de forma rápida medios nutritivos en polvo seco estables nutricionalmente complejos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores, que pueden prepararse en cantidades variables a granel y que son susceptibles a la esterilización particularmente por irradiación ionizante o ultravioleta.
- ### RESUMEN DE LA INVENCION
- En un aspecto, la invención proporciona un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos que soporta el cultivo de una célula *in vitro* que comprende partículas de aproximadamente 1-100 mesh de tamaño, y que comprende vitaminas y aminoácidos.
- En otro aspecto la invención proporciona el uso de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la invención para cultivar células en donde el medio nutritivo en polvo, el suplemento de medio, el subgrupo de medio o amortiguador o combinación de estos se reconstituye en un disolvente antes de contactar las células.
- En otro aspecto la invención proporciona un estuche que comprende el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la invención.
- En un aspecto adicional la invención proporciona un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos que comprende partículas de aproximadamente 1-100 mesh que sostiene el cultivo de una célula *in vitro*, que comprende vitaminas y aminoácidos, que se disuelve de forma rápida para producir una solución de pH automáticamente ajustado tras la reconstitución, y que opcionalmente es un medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador de un solo componente o combinación de estos obtenido al mezclar los componentes individuales.
- En otro aspecto la invención proporciona un método para reconstituir un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo aglomerado o combinación de estos de la invención, en donde el método comprende la reconstitución del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador o combinación de estos con un disolvente.
- Los polvos de medios nutritivos particularmente preferidos de acuerdo con la invención incluyen polvos de medios de cultivo seleccionados del grupo que consiste en un polvo de medio de cultivo bacteriano, un polvo de medio de cultivo de levadura, un polvo de medio de cultivo vegetal y un polvo de medio de cultivo animal.
- Los suplementos de medios particularmente preferidos de la invención incluyen: sueros animales en polvo, tales como sueros bovinos (*por ejemplo*, fetal bovino, ternero recién nacido o suero normal de ternero), suero humano, suero equino, suero porcino, suero de mono, suero de simio, suero de rata, suero murino, suero de conejo, suero ovino y similares; citocinas (que incluyen factores de crecimiento (tales como EGF, aFGF, bFGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF y

similares), interleucinas, factores estimulantes de colonias e interferones); factores de adhesión o componentes de la matriz extracelular (tales como colágenos, lamininas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibronectina, vitronectina y similares); lípidos (tales como fosfolípidos, colesterol, concentrado de colesterol bovino, ácidos grasos, esfingolípidos y similares); y extractos de tejidos, órganos o glándulas animales (tales como extracto de pituitaria bovina, extracto de cerebro bovino, extracto de embrión de pollo, extracto de embrión bovino, extracto de carne de pollo, tendón de aquiles y extractos de este) y similares). Otros suplementos de medios que pueden producirse mediante los presentes métodos incluyen una variedad de proteínas (tales como albúminas séricas, particularmente albúminas séricas bovina o humana; inmunoglobulinas y fragmentos o complejos de estas; aprotinina; hemoglobina; hemina o hematina; enzimas (tales como tripsina, colagenasas, pancreatinina o dispasa); lipoproteínas; ferritina; etc.) que pueden ser naturales o recombinantes; vitaminas; aminoácidos y variantes de estos (que incluyen, pero sin limitarse a, L-glutamina y cistina), cofactores enzimáticos y otros componentes útiles en el cultivo de células *in vitro* que serán familiares a un experto.

Los medios nutritivos y los suplementos de medios de la invención pueden comprender además subgrupos tales como suero (preferentemente los descritos anteriormente), L-glutamina, insulina, transferrina, uno o más lípidos (preferentemente uno o más fosfolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos o colesterol), una o más citocinas (preferentemente las descritas anteriormente), uno o más neurotransmisores, uno o más extractos de tejidos, órganos o glándulas animales (preferentemente los descritos anteriormente), una o más proteínas (preferentemente las descritas anteriormente) o uno o más amortiguadores (preferentemente bicarbonato de sodio), o cualquier combinación de estos.

Los polvos de amortiguadores particularmente adecuados de acuerdo con la invención incluyen polvos de solución salina amortiguada, más particularmente polvos de solución salina amortiguada con fosfato o polvos de solución salina amortiguada con Tris.

La invención proporciona además polvos de medio nutritivo, polvos de suplemento del medio (que incluyen polvos de los suplementos descritos anteriormente) y polvos de amortiguadores.

La invención se refiere adicionalmente a métodos para preparar medios de cultivo, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo estériles. Uno de esos métodos comprende exponer los medios de cultivo, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo descritos anteriormente a irradiación γ de tal manera que las bacterias, hongos, esporas y virus que pueden residir en los polvos se vuelven incapaces de replicarse. En un método preferido tal, los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo se irradian con γ a una dosificación total de aproximadamente 10-100 kilograys (kGy), preferentemente una dosificación total de aproximadamente 15-75 kGy, 15-50 kGy, 15-40 kGy o 20-40 kGy, con mayor preferencia una dosificación total de aproximadamente 20-30 kGy, y con la máxima preferencia una dosificación total de aproximadamente 25 kGy, por aproximadamente 1 hora a aproximadamente 7 días, preferentemente por aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 días, con mayor preferencia por aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 días, aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas o aproximadamente 1-5 horas, y con la máxima preferencia aproximadamente 1-3 horas. La invención se refiere además a medios de cultivo, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo estériles producidos mediante estos métodos.

La invención proporciona adicionalmente métodos que se refieren a cultivar una célula que comprenden reconstituir el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador de la invención con un disolvente, que comprende preferentemente suero o agua, y contactar la célula con el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador reconstituido bajo condiciones que favorecen el cultivo de la célula. Cualquier célula puede cultivarse de acuerdo con los presentes métodos, particularmente las células bacterianas, células de levaduras, células vegetales o células animales. Las células animales preferidas para cultivar mediante los presentes métodos incluyen células de insectos (con la máxima preferencia células de *Drosophila*, células de *Spodoptera* y células de *Trichoplusa*), células de nemátodos (con la máxima preferencia células de *C. elegans*) y células de mamífero (con la máxima preferencia células CHO, células COS, células VERO, células BHK, células AE-1, células SP2/0, células L5.1, células de hibridoma o células humanas). Las células cultivadas de acuerdo con este aspecto de la invención pueden ser células normales, células enfermas, células transformadas, células mutantes, células somáticas, células germinales, células madres, células precursoras o células embrionarias, cualquiera de las cuales pueden ser líneas celulares establecidas u obtenerse a partir de fuentes naturales.

La invención se dirige adicionalmente a estuches para el uso en el cultivo de una célula. Los estuches de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más envases que contienen uno o más de los polvos de medios nutritivos, polvos de suplementos de medios, polvos de subgrupos de medios o polvos de amortiguadores de la invención, o cualquier combinación de estos. Los estuches pueden comprender además una o más células o tipos celulares, que incluyen los polvos de células secas de la invención.

Otras modalidades preferidas de la presente invención resultarán evidentes a un experto a la luz de los siguientes dibujos y la descripción de la invención, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **La Figura 1** es un histograma de una exploración densitométrica del SDS-PAGE de muestras de suero fetal bovino (FBS) preparadas en forma de polvo mediante los métodos de la descripción (Figura 1A) y FBS líquido convencional (Figura 1B).
- 10 **La Figura 2** es un conjunto de gráficos de líneas de crecimiento (Figura 2A) y éxito de los pases (Figura 2B) de células SP2/0 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 2% (p/v) FBS preparado en forma de polvo mediante los métodos de aglomeración de la descripción.
- 15 **La Figura 3** es un conjunto de histogramas de exploraciones espectrofotométricas ($\lambda = 200\text{-}350\text{ nm}$) de suero fetal bovino en polvo (FBS) preparado mediante secado por atomización de acuerdo con los métodos de la descripción (Figura 3A) o de FBS líquido estándar (Figura 3B).
- 20 **La Figura 4** es un conjunto de gráficos de líneas que muestra la valoración del pH (capacidad amortiguadora), en dos fechas diferentes (Figuras 4A y 4B), de varios medios en polvo seco (DPM) preparados mediante los métodos de la descripción o mediante trituración en molino de bolas, con o sin la adición de bicarbonato de sodio.
- 25 **La Figura 5** es un conjunto de gráficos de barras que muestra el efecto de la aglomeración sobre las velocidades de disolución (en agua) de Opti-MEM I™ (Figura 5A) o DMEM (Figura 5B). Los medios se aglomeraron con agua o FBS como se indica.
- La Figura 6** es un conjunto de gráficos de líneas que muestra el crecimiento durante siete días de células SP2/0 en Opti-MEM I™ aglomerado (Figura 6A) o DMEM (Figura 6B), ambos contienen 2% FBS.
- La Figura 7** es un conjunto de gráficos de líneas que muestra el crecimiento durante siete días de células SP2/0 (Figura 7A), células AE-1 (Figura 7B) y células L5.1 (Figura 7C) en DMEM aglomerado que contiene 10% FBS.
- 30 **La Figura 8** es un conjunto de gráficos de líneas que muestra el éxito de los pases de células SP2/0 en Opti-MEM I™ (Figura 8A) o DMEM (Figura 8B), aglomerado ya sea con agua o FBS, suplementado con 2% FBS.
- 35 **La Figura 9** es un conjunto de gráficos de líneas que muestra el éxito de los pases de células SP2/0 (Figura 9A), células AE-1 (Figura 9B) y células LS,1 (Figura 9C) en DMEM aglomerado con FBS o bicarbonato de sodio y suplementado con 10% FBS.
- 40 **La Figura 10** es un gráfico de líneas que muestra el crecimiento de células SP2/0 durante cuatro pases en medio de cultivo en polvo estándar reconstituido en agua (medio de control), o en medio de cultivo en polvo aglomerado preparado en cantidades a gran escala de acuerdo con los métodos de la descripción. Los resultados se muestran para el medio de control ($\square$), el medio de cultivo en polvo aglomerado con agua de la invención ($\blacklozenge$) y el medio de cultivo en polvo auto-pH aglomerado con agua (que contiene bicarbonato de sodio) de la invención ($\blacksquare$).
- 45 **La Figura 11** es un gráfico de líneas de células AE-1 cultivadas durante seis o siete días en medio que contiene 2% ($\blacktriangle$) o 10% ($\blacklozenge$) de suero fetal bovino líquido (FBS), o 2% ($\times$) o 10% ($\blacksquare$) de FBS en polvo preparado mediante los métodos de secado por atomización de la descripción. Los experimentos duplicados se muestran en las Figuras 11A y 11B.
- La Figura 12** es un gráfico de líneas de células SP2/0 cultivadas durante siete días en medio que contiene 2% ($\blacktriangle$) o 10% ($\blacklozenge$) de FBS líquido, o 2% ($\times$) o 10% ($\blacksquare$) de FBS en polvo preparado mediante los métodos de secado por atomización de la descripción. Los experimentos duplicados se muestran en las Figuras 12A y 12B.
- 50 **La Figura 13** es un gráfico de líneas del crecimiento de células AE-1 durante cuatro pases en medio que contiene 5% de FBS líquido ($\blacklozenge$) o 5% de FBS en polvo preparado mediante los métodos de secado por atomización de la descripción ($\blacksquare$).
- 55 **La Figura 14** es un gráfico de líneas que indica el efecto de la irradiación γ y la aglomeración sobre el crecimiento de células SP2/0 durante cinco días.
- La Figura 15** es un gráfico de barras que indica el efecto de la irradiación γ sobre el crecimiento de células VERO en medio de cultivo aglomerado.
- 60 **La Figura 16** es una serie de gráficos de líneas que indica el efecto de la irradiación γ sobre la capacidad de la transferrina para sostener el crecimiento de células 293 durante cuatro pases. En cada gráfico, las células se cultivaron

en medio 293 estándar libre de suero (◆), en medio sin transferrina (■), en medio que contiene transferrina en polvo que se había irradiado con γ a -70°C (▲) o a temperatura ambiente (*), o en medio que contiene transferrina en polvo que no se había irradiado con γ pero que se había almacenado a -70°C (×) o a temperatura ambiente (•). Los resultados para cada punto de datos son los promedios de frascos duplicados.

Fig. 16A: células del pase 1;
Fig. 16B: células del pase 2;
Fig. 16C: células del pase 3;
Fig. 16D: células del pase 4.

La Figura 17 es una serie de gráficos de barras que indica el efecto de la irradiación γ , bajo condiciones de irradiación diferentes, sobre la capacidad del FBS para sostener el crecimiento de las células independientes de anclaje (Figuras 17A y 17B) y las células dependientes de anclaje (Figuras 17C y 17D) en el primer (Px1), segundo (Px2) y tercer (Px3) pase.

Fig. 17A: células SP2/0;
Fig. 17B: células AE-1;
Fig. 17C: células VERO;
Fig. 17D: células BHK.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

En la descripción que sigue, se utilizan ampliamente una serie de términos de uso convencional en el campo de los medios de cultivo celular. Con el objetivo de proporcionar una comprensión clara y consistente de la especificación y las reivindicaciones, y del alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

El término "polvo" como se usa en la presente se refiere a una composición que está presente en forma granular, que puede estar o no en complejo o aglomerada con un disolvente tal como agua o suero. El término "polvo seco" puede usarse indistintamente con el término "polvo;" sin embargo, "polvo seco" como se usa en la presente se refiere simplemente a la apariencia macroscópica del material granulado y no pretende dar a entender que el material está completamente libre de disolvente en complejo o aglomerado a menos que se indique de cualquier otra manera.

El término "ingrediente" se refiere a cualquier compuesto, ya sea de origen químico o biológico, que puede usarse en medios de cultivo celular para mantener o promover el crecimiento de la proliferación de las células. Los términos "componente", "nutriente" e "ingrediente" pueden usarse indistintamente y se entiende que todos se refieren a tales compuestos. Los ingredientes típicos que se usan en los medios de cultivo celular incluyen aminoácidos, sales, metales, azúcares, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, vitaminas, ácidos grasos, proteínas y similares. Otros ingredientes que promueven o mantienen el cultivo de células *ex vivo* pueden seleccionarse por aquellos con experiencia en la técnica, de acuerdo con la necesidad en particular.

El término "citocina" se refiere a un compuesto que induce una respuesta fisiológica en una célula, tal como crecimiento, diferenciación, senescencia, apoptosis, citotoxicidad o secreción de anticuerpos. En esta definición de "citocina" están incluidos factores de crecimiento, interleucinas, factores estimulantes de colonias, interferones y linfocinas.

Por "cultivo celular" o "cultivo" se entiende el mantenimiento de células en un medio ambiente artificial, *por ejemplo, in vitro*. Debe entenderse, sin embargo, que el término "cultivo celular" es un término genérico y puede usarse para abarcar el cultivo no sólo de células procariotas (*por ejemplo*, bacterianas) o eucariotas (*por ejemplo*, animales, vegetales y fúngicas) individuales, sino además de tejidos, órganos, sistemas de órganos u organismos completos, para los que los términos "cultivo de tejidos", "cultivo de órganos", "cultivo de sistema de órganos" o "cultivo organotípico" pueden usarse de forma ocasional indistintamente con el término "cultivo celular".

Por "cultivo" se entiende el mantenimiento de células en un medio ambiente artificial bajo condiciones que favorecen el crecimiento, la diferenciación o la continuación de la viabilidad, en un estado activo o en reposo, de las células. Por lo tanto, "cultivo" puede usarse indistintamente con "cultivo celular" o cualquiera de sus sinónimos descritos anteriormente.

Por "recipiente de cultivo" se entiende un envase de vidrio, plástico, o metal que puede proporcionar un medio ambiente aséptico para cultivar células.

Las frases "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" (plural "medios" en cada caso) y "formulación de medio" se

refieren a una solución nutritiva que sostiene el cultivo y/o crecimiento de células; estas frases pueden usarse indistintamente.

5 Por "extracto" se entiende una composición que comprende una preparación concentrada de los subgrupos de una sustancia, formada típicamente por el tratamiento de la sustancia ya sea de forma mecánica (*por ejemplo*, por tratamiento con presión) o de forma química (*por ejemplo*, por destilación, precipitación, acción enzimática o tratamiento de sales elevadas).

10 Por "digestión enzimática" se entiende una composición que comprende un tipo de extracto especializado, específicamente uno preparado mediante el tratamiento de la sustancia que se va a extraer (*por ejemplo*, componentes vegetales o células de levadura) con al menos una enzima capaz de descomponer los componentes de la sustancia en formas más simples (*por ejemplo*, en una preparación que comprende mono- o disacáridos y/o mono-, di- o tripéptidos). En este contexto, y para los propósitos de la presente invención, el término "hidrolizado" puede usarse indistintamente con el término "digestión enzimática".

15 El término "contactar" se refiere a la colocación de las células que se van a cultivar en un recipiente de cultivo con el medio en el que las células van a cultivarse. El término "contactar" abarca mezclar células con medio, pipetear medio a las células en un recipiente de cultivo, y sumergir células en medio de cultivo.

20 El término "combinar" se refiere al mezclado o mezcla de ingredientes en una formulación de medio de cultivo celular.

Un medio de cultivo celular está compuesto de una serie de ingredientes y estos ingredientes varían de un medio de cultivo a otro. Se entiende que una "formulación 1X" se refiere a cualquier solución acuosa que contiene algunos o todos los ingredientes que se encuentran en un medio de cultivo celular en concentraciones de trabajo. La "formulación 1X" puede referirse a, por ejemplo, el medio de cultivo celular o a cualquier subgrupo de ingredientes para ese medio. La concentración de un ingrediente en una solución 1X es aproximadamente la misma que la concentración de ese ingrediente que se encuentra en una formulación de cultivo celular usada para mantener o cultivar células *in vitro*. Un medio de cultivo celular usado para el cultivo de células *in vitro* es por definición una formulación 1X. Cuando una serie de ingredientes está presente, cada ingrediente en una formulación 1X tiene una concentración aproximadamente igual a la concentración de los ingredientes en un medio de cultivo celular. Por ejemplo, el medio de cultivo RPMI-1640 contiene entre otros ingredientes, 0.2 g/L de L-arginina, 0.05 g/L de L-asparagina, y 0.02 g/L de ácido L-aspártico. Una "formulación 1X" de estos aminoácidos contiene aproximadamente las mismas concentraciones de estos ingredientes en solución. Por lo tanto, cuando se refiere a una "formulación 1X", se pretende que cada ingrediente en solución tiene la misma o aproximadamente la misma concentración que la que se encuentra en el medio de cultivo celular que se describe. Las concentraciones de los ingredientes en una formulación 1X de medio de cultivo celular son bien conocidas por los expertos en la técnica. Ver *Methods For Preparation of Media, Supplements and Substrate For Serum-Free Animal Cell Culture* Allen R. Liss, N.Y. (1984). La osmolalidad y/o el pH, sin embargo, pueden diferir en una formulación 1X en comparación con el medio de cultivo, particularmente cuando la formulación 1X contiene menos ingredientes.

40 Se entiende que una "formulación 10X" se refiere a una solución en donde cada ingrediente en esa solución está aproximadamente 10 veces más concentrado que el mismo ingrediente en el medio de cultivo celular. Por ejemplo, una formulación 10X de medio de cultivo RPMI-1640 puede contener, entre otros ingredientes, 2.0 g/L de L-arginina, 0.5 g/L de L-asparagina, y 0.2 g/L de ácido L-aspártico (comparar con la formulación 1X, anteriormente). Una "formulación 10X" puede contener una serie de ingredientes adicionales a una concentración aproximadamente 10 veces la que se encuentra en el medio de cultivo 1X. Como resultará fácilmente evidente, "formulación 20X", "formulación 25X", "formulación 50X" y "formulación 100X" designan soluciones que contienen ingredientes a aproximadamente 20-, 25-, 50- o 100- veces la concentración, respectivamente, en comparación con un medio de cultivo celular 1X. De nuevo, la osmolalidad y el pH de la formulación de medio y la solución concentrada pueden variar, Ver patente de los Estados Unidos núm. 5,474,931, que está dirigida a la tecnología para concentrar medios de cultivo.

50 Perspectiva general

La descripción proporciona métodos para producir medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores. Los medios nutritivos, suplementos de medios y subgrupos de medios producidos mediante los presentes métodos son cualquier medio, suplemento de medio o subgrupo de medio (libre de suero o que contiene suero) que pueden usarse para sostener el crecimiento de una célula, que puede ser una célula bacteriana, una célula fúngica (particularmente una célula de levadura), una célula vegetal o una célula animal (particularmente una célula de insecto, una célula de nemátodo o una célula de mamífero, con la máxima preferencia una célula humana), cualquiera de las cuales puede ser una célula somática, una célula germinal, una célula normal, una célula enferma, una célula transformada, una célula mutante, una célula madre, una célula precursora o una célula embrionaria. Los medios nutritivos preferidos incluyen, pero sin limitarse a, medios de cultivo celular, con la máxima preferencia un medio de cultivo de células bacterianas, medio de cultivo de células vegetales o medio de cultivo de células animales. Los

suplementos de medios preferidos incluyen, pero sin limitarse a, suplementos indefinidos tales como extractos de células bacterianas, animales o vegetales, glándulas, tejidos u órganos (particularmente extracto de pituitaria bovina, extracto de cerebro bovino y extracto de embrión de pollo); y fluidos biológicos (particularmente suero animal, y con la máxima preferencia suero bovino (particularmente fetal bovino, ternero recién nacido o suero normal de ternero), suero de caballo, suero porcino, suero de rata, suero murino, suero de conejo, suero de mono, suero de simio o suero humano, cualquiera de los cuales puede ser suero fetal) y extractos de estos (con mayor preferencia albúmina sérica y con la máxima preferencia albúmina sérica bovina o albúmina sérica humana). Los suplementos de medios pueden incluir además reemplazos definidos tales como LipoMAX®, OptiMAB®, Knock-Out™ SR (cada uno disponible de Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland), y similares, que pueden usarse como sustitutos de los suplementos de medios indefinidos descritos anteriormente. Tales suplementos pueden comprender además componentes definidos, que incluyen pero sin limitarse a, hormonas, citocinas, neurotransmisores, lípidos, factores de adhesión, proteínas y similares.

Los medios nutritivos pueden dividirse además en varios subgrupos (ver la patente de los Estados Unidos núm. 5,474,931) que pueden prepararse mediante, y usarse de acuerdo con, los métodos descritos. Tales subgrupos pueden combinarse para producir los medios nutritivos de la presente invención.

Mediante los métodos de la descripción, cualquier medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador puede producirse y almacenarse por un período de tiempo prolongado sin pérdida significativa de la actividad biológica y bioquímica. Por "sin pérdida significativa de la actividad biológica y bioquímica" se entiende una disminución de menos de aproximadamente 30%, preferentemente menos de aproximadamente 25%, con mayor preferencia menos de aproximadamente 20%, aún con mayor preferencia menos de aproximadamente 15%, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 10%, de la actividad biológica o bioquímica del medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador cuando se compara con un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador de la misma formulación recién hecho. Por un "período de tiempo prolongado" se entiende un período de tiempo más largo que aquel por el que se almacena un medio nutritivo, suplemento, subgrupo o amortiguador cuando se prepara mediante métodos tradicionales tales como trituración en molino de bolas. Como se usa en la presente, un "período de tiempo prolongado" significa por ello aproximadamente 1-36 meses, aproximadamente 2-30 meses, aproximadamente 3-24 meses, aproximadamente 6-24 meses, aproximadamente 9-18 meses, o aproximadamente 4-12 meses, bajo una condición de almacenamiento dada, que puede incluir el almacenamiento a temperaturas de aproximadamente -70°C a aproximadamente 25 °C, aproximadamente -20°C a aproximadamente 25°C, aproximadamente 0°C a aproximadamente 25°C, aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C, aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. Los ensayos para determinar la actividad biológica o bioquímica de un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador son bien conocidos en la técnica y son familiares a un experto.

Formulación de medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores

Cualquier medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador puede prepararse mediante los métodos de la descripción. Los medios nutritivos, suplementos de medios y subgrupos de medios que pueden prepararse de acuerdo con la invención incluyen medios de cultivo celular, suplementos de medios y subgrupos de medios que sostienen el crecimiento de células animales, células vegetales, células bacterianas o células de levadura. Los amortiguadores particularmente preferidos que pueden prepararse de acuerdo con la invención incluyen soluciones de sales balanceadas que son isotónicas para células animales, células vegetales, células bacterianas o células de levadura.

Los ejemplos de medios de cultivo de células animales que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, DMEM, RPMI-1640, MCDB 131, MCDB 153, M17EM, IMDM, MEM, M199, 5A de McCoy, Medio E de Williams, 1 de Leibovitz, Medio-15, Medio de Insecto de Grace, Medio de Insecto IPL-41, Medio de Insecto TC-100, Medio de *Drosophila* de Schneider, medio de cultivo de anfibios de Wolf & Quimby, medios libres de suero de células específicas (SPM) tales como los diseñados para sostener el cultivo de queratinocitos, células endoteliales, hepatocitos, melanocitos, etc., Mezcla nutriente F10 y Mezcla nutriente F12. Otros medios, suplementos de medios y subgrupos de medios adecuados para la preparación mediante la invención están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland, y Sigma; St. Louis, Missouri). Las formulaciones para estos medios, suplementos de medios y subgrupos de medios, así como también muchos otros medios de cultivo de células animales, suplementos de medios y subgrupos de medios usados comúnmente son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo en el Catálogo y guía de referencia de GIBCO/BRL (Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland) y en el Catálogo de células animales de Sigma (Sigma; St. Louis, Missouri).

Los ejemplos de medios de cultivo de células vegetales que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, medio de cultivo vegetal de Anderson, medio basal CLC, medio de Gamborg, medio de

5 cultivo de plantas marinas de Guillard, medio marino de Provasoli, medio de Kao y Michayluk, medio de Murashige y Skoog, medios de plantas leñosas de McCown, medio de orquídeas de Knudson, medio de orquídeas de Lindemann, y medio de Vacin y Went. Las formulaciones para estos medios, que están disponibles comercialmente, así como también para muchos otros medios de cultivo de células vegetales usados comúnmente, son bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo en el Catálogo de cultivo de células vegetales de Sigma (Sigma; St. Louis, Missouri).

10 Los ejemplos de medios de cultivo de células bacterianas que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, medio tripticasa de soya, medio infusión cerebro corazón, medio extracto de levadura, medio extracto de levadura-peptona, medio infusión de carne de res, medio tioglicolato, medio indol-nitrato, medio MR-VP, medio citrato de Simmans, medio CTA, medio bilis esculina, medio Bordet-Gengou, medio carbón extracto de levadura (CYE), medio manitol-sal, medio de MacConkey, medio eosina-azul de metileno (EMB), medio Thayer-Martin, medio Salmonella-Shigella, y medio ureasa. Las formulaciones para estos medios, que están disponibles comercialmente, así como también para muchos otros medios de cultivo de células bacterianas usados comúnmente, son bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo en el Manual DIFCO (DIFCO; Norwood, Massachusetts) y en el Manual de microbiología clínica (Sociedad americana de microbiología, Washington, DC).

20 Los ejemplos de medios de cultivo de células fúngicas, particularmente medios de cultivo de células de levadura, que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, medio Sabouraud y medio de morfología de levaduras (YMA). Las formulaciones para estos medios, que están disponibles comercialmente, así como también para muchos otros medios de cultivo de células de levadura usados comúnmente, son bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo en el Manual DIFCO (DIFCO; Norwood, Massachusetts) y en el Manual de microbiología clínica (Sociedad americana de microbiología, Washington, DC).

25 Como apreciará el técnico con experiencia, cualquiera de los medios anteriores de la invención puede incluir además uno o más componentes adicionales, tales como agentes indicadores o de selección (*por ejemplo*, colorantes, antibióticos, aminoácidos, enzimas, sustratos y similares), filtros (*por ejemplo*, carbón), sales, polisacáridos, iones, detergentes, estabilizadores, y similares.

30 En una modalidad particularmente preferida de la invención, los medios de cultivo descritos anteriormente pueden comprender una o más sales amortiguadoras, preferentemente bicarbonato de sodio, a concentraciones suficientes para proporcionar capacidad amortiguadora óptima al medio de cultivo. De acuerdo con un aspecto de la invención, una sal amortiguadora, tal como bicarbonato de sodio, puede adicionarse en forma de polvo al medio en polvo antes, durante o después de la aglomeración del medio. En un ejemplo de este aspecto de la invención, el bicarbonato de sodio puede adicionarse al medio de cultivo antes, durante o después de la aglomeración con un disolvente adecuado (tal como agua, suero o un agente de ajuste de pH tal como un ácido (*por ejemplo*, HCl a una concentración de 1M a 5M, preferentemente a 1M) o una base (*por ejemplo*, NaOH a una concentración de 1M a 5M, preferentemente a 1M) de tal manera que, tras la reconstitución del medio aglomerado el medio de cultivo está al pH óptimo o sustancialmente óptimo para el cultivo de una variedad de tipos celulares. Por ejemplo, los medios de cultivo de células bacterianas preparados mediante los presentes métodos tendrán, tras la reconstitución, preferentemente un pH de aproximadamente 4-10, con mayor preferencia aproximadamente 5-9 o aproximadamente 6-8.5; los medios de cultivo de células fúngicas (*por ejemplo*, levadura) preparados mediante los presentes métodos tendrán, tras la reconstitución, preferentemente un pH de aproximadamente 3-8, con mayor preferencia aproximadamente 4-8 o aproximadamente 4-7.5; los medios de cultivo de células animales preparados mediante los presentes métodos tendrán, tras la reconstitución, preferentemente un pH de aproximadamente 6-8 o aproximadamente 7-8, con mayor preferencia aproximadamente 7-7.5 o aproximadamente 7.2-7.4; y los medios de cultivo de células vegetales preparados mediante los presentes métodos tendrán, tras la reconstitución, preferentemente un pH de aproximadamente 4-8, preferentemente aproximadamente 4.5-7, 5-6 o 5.5-6. Por supuesto, el pH óptimo para un medio de cultivo dado que se va a usar en un tipo celular particular puede determinarse además empíricamente por el experto mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

50 En otro ejemplo, una o más sales amortiguadoras, *por ejemplo*, bicarbonato de sodio, puede adicionarse directamente a un medio nutritivo en polvo al aglomerar el(los) amortiguador(es) en el medio mediante el uso de un aparato de lecho fluidizado, o al secar por atomización el(los) amortiguador(es) en un medio en polvo seco o aglomerado (mediante el uso de un aparato de secado por atomización como se describe más abajo). En un aspecto relacionado, puede adicionarse un agente de ajuste de pH tal como un ácido (*por ejemplo*, HCl) o una base (*por ejemplo*, NaOH) a un medio nutritivo en polvo, que puede contener una o más sales amortiguadoras (tal como bicarbonato de sodio), mediante la aglomeración del agente de ajuste de pH en el medio nutritivo en polvo en un aparato de lecho fluidizado, mediante el secado por atomización del agente de ajuste de pH en el medio nutritivo en polvo o aglomerado, o mediante una combinación de estos; este enfoque obvia la adición posterior de un agente de ajuste de pH luego de la reconstitución del medio en polvo por lo tanto, la invención proporciona un medio de cultivo nutritivo en polvo útil en el cultivo o crecimiento de células *in vitro* que, tras la reconstitución con un disolvente (*por ejemplo*, agua o suero), tiene un pH que es óptimo para el sostenimiento del cultivo o crecimiento celular sin necesidad de ajuste del pH del medio líquido. Este tipo de medio, definido en la presente como "medio de ajuste automático del pH", obvia por ello las etapas

que consumen tiempo y propensas a error de adicionar amortiguador(es) al medio luego de la reconstitución y ajustar el pH del medio luego de la disolución del(de los) amortiguador(es). Por ejemplo, un medio de cultivo de células de mamífero preparado de acuerdo con estos métodos puede, tras la reconstitución, tener un pH de entre aproximadamente 7.1 a aproximadamente 7.5, con mayor preferencia entre aproximadamente 7.1 a aproximadamente 7.4, y con la máxima preferencia aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.4 o aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.3. La preparación de un ejemplo de tal medio de cultivo de ajuste automático del pH se muestra en más detalle más abajo en los Ejemplos 3 y 6.

Los ejemplos de suplementos de medios que pueden prepararse como polvos mediante los presentes métodos incluyen, sin limitarse a, sueros animales (tal como suero bovino (*por ejemplo*, fetal bovino, suero de ternero recién nacido y de ternero), suero humano, suero equino, suero porcino, suero de mono, suero de simio, suero de rata, suero murino, suero de conejo, suero ovino y similares), reemplazos definidos tales como LipoMAX®, OptiMab®, Knock-Out™ SR (cada uno disponible de Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland), hormonas (que incluyen hormonas esteroides tales como corticosteroides, estrógenos, andrógenos (*por ejemplo*, testosterona) y hormonas peptídicas tales como insulina, citocinas (que incluyen factores de crecimiento (*por ejemplo*, EGF, aFGF, bFGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF y similares), interleucinas, factores estimulantes de colonias, interferones y similares), neurotransmisores, lípidos que incluyen fosfolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos, colesterol y similares), factores de adhesión (que incluyen componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, vitronectina, lamininas, colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y similares), y extractos de tejidos, órganos o glándulas animales (tales como extracto de pituitaria bovina, extracto de cerebro bovino, extracto de embrión de pollo, extracto de embrión bovino, extracto de carne de pollo, tendón de aquiles y extractos de este) y similares). Otros suplementos de medios que pueden producirse mediante los presentes métodos incluyen una variedad de proteínas (tales como albúminas séricas, particularmente albúminas séricas bovina o humana; inmunoglobulinas y fragmentos o complejos de estas; aprotinina; hemoglobina; hemina o hematina; enzimas (tales como tripsina, colagenasas, pancreatina o dispasa); lipoproteínas; fetuina; ferritina; etc.), que pueden ser naturales o recombinantes; vitaminas; aminoácidos y variantes de estos (que incluyen, pero sin limitarse a, L-glutamina y cistina), cofactores enzimáticos; polisacáridos; sales o iones (que incluyen elementos traza tales como sales o iones de molibdeno, vanadio, cobalto, manganeso, selenio, y similares); y otros suplementos y composiciones que son útiles en el cultivo de células *in vitro* que serán familiares a un experto. Estos sueros y otros suplementos de medios están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland, y Sigma Cell Culture, St. Louis, Missouri); alternativamente, los sueros y otros suplementos de medios descritos anteriormente pueden aislarse a partir de sus fuentes naturales o producirse de forma recombinante mediante métodos conocidos en la técnica que serán de rutina a un experto (*ver* Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells*, Nueva York: Alan R. Liss, Inc, págs. 74-78 (1983), y las referencias citadas en los mismos; *ver además* Harlow, E., y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 116-120 (1988)).

Los ejemplos de amortiguadores que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, formulaciones de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), formulaciones de solución salina amortiguada con Tris (FBS), formulaciones de solución salina amortiguada con HEPES (HBS), soluciones de sales balanceadas de Hanks (HBSS), PBS de Dulbecco (DPBS), soluciones de sales balanceadas de Earle, soluciones salinas de Puck, soluciones de sales basales de plantas de Murashige y Skoog, soluciones de sales basales de plantas marinas de Keller, soluciones de sales basales de plantas marinas de Provasoli, y soluciones de sales basales de Michayluk y Kao. Las formulaciones para estos amortiguadores, que están disponibles comercialmente, así como también para muchos otros amortiguadores usados comúnmente, son bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo, en el Catálogo y guía de referencia de GIBCO/BRL (Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland), en el Manual DIFCO (DIFCO; Norwood, Massachusetts), y en los Catálogos de cultivo celular de Sigma para el cultivo de células animales y vegetales (Sigma; St. Louis, Missouri).

Preparación de medios en polvo, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores

Los métodos de la descripción proporcionan la preparación de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo descritos anteriormente. Estos medios, suplementos, subgrupos y amortiguadores en polvo se preparan mediante el uso de la tecnología de lecho fluidizado (*es decir*, "aglomeración").

Los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo se preparan mediante el uso de la tecnología de lecho fluidizado para aglomerar las soluciones de medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores, lo que produce de esta manera sus formas en polvo seco. La tecnología de lecho fluidizado es un proceso para producir polvos aglomerados que tienen características alteradas (particularmente, por ejemplo, solubilidad) a partir de los materiales de partida. En aplicaciones generales de la tecnología, los polvos se suspenden en una columna de aire en movimiento ascendente mientras que al mismo tiempo se inyecta una cantidad controlada y definida de líquido en la corriente de polvo para producir un estado húmedo del polvo, después se usa calor suave para secar el material, lo que produce un polvo aglomerado.

Los aparatos para producir y/o procesar materiales particulados mediante la tecnología de lecho fluidizado están disponibles comercialmente (*por ejemplo*, de Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland), y se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos núms. 3,771,237; 4,885,848; 5,133,137; 5,357,688; y 5,392,531; y en documento WO 95/13867. Tales aparatos se han usado para preparar polvos aglomerados de varios materiales, que incluyen suero de la leche (patente de los Estados Unidos núm. 5,006,204), emulsiones cárnicas aciduladas (patente de los Estados Unidos núm. 4,511,592), proteasas (patente de los Estados Unidos núm. 4,689,297) y otras proteínas (DK 167090 B1), y bicarbonato de sodio (patente de los Estados Unidos núm. 5,325,606).

La tecnología de lecho fluidizado puede usarse para preparar medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores aglomerados a granel. Un medio nutritivo en polvo seco, suplemento de medio o amortiguador se coloca en un aparato de lecho fluidizado y se somete a aglomeración en el mismo. Los medios nutritivos en polvo (particularmente medios de cultivo celular en polvo), suplementos de medios en polvo (particularmente sueros animales en polvo) y amortiguadores en polvo (particularmente soluciones salinas amortiguadas en polvo), pueden obtenerse preelaborados a partir de fuentes comerciales (*por ejemplo*, Life Technologies, Inc.; Rockville, Maryland). Alternativamente, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo pueden hacerse mediante la mezcla de los componentes individuales o grupos de componentes de acuerdo con las formulaciones descritas anteriormente. Tales formulaciones pueden incluir componentes que típicamente no están presentes en formulaciones de medio nutritivo en polvo, suplemento de medio, subgrupo de medio y amortiguador debido a su inestabilidad, tales como suero, L-glutamina, cistina, insulina, transferrina, lípidos (particularmente fosfolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos y colesterol), citocinas (particularmente factores de crecimiento, interleucinas, factores estimulantes de colonias e interferones), neurotransmisores y amortiguadores (particularmente bicarbonato de sodio). Si se adiciona L-glutamina a la formulación, puede ser en forma de un complejo con cationes divalentes tales como calcio o magnesio (*ver*, patente de los Estados Unidos núm. 5,474,931). En otro ejemplo, dos o más componentes en polvo pueden mezclarse y después aglomerarse para producir medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores complejos. Por ejemplo, un medio nutritivo en polvo puede mezclarse con un suero en polvo (producido, por ejemplo, mediante secado por atomización como se describe más abajo) tal como FBS a una concentración del suero de aproximadamente 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% o más elevada (p/p como un porcentaje del medio en polvo); la mezcla de medio-suero en polvo resultante puede después aglomerarse para producir un complejo medio-suero aglomerado que se disolverá fácilmente en un disolvente reconstituyente y por lo tanto estará listo para el uso sin suplementación adicional.

Una vez que el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo (o mezcla de estos) se coloca en el aparato de lecho fluidizado, se somete a suspensión en una columna de un gas en movimiento ascendente, preferentemente aire atmosférico o un gas inerte tal como nitrógeno, y se pasa a través de uno o más filtros de partículas. Dado que la mayoría de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo seco no aglomerados, son de un tamaño de partícula relativamente pequeño, los filtros que se van a usar en la preparación de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo (o mezcla de estos) de la invención deben ser tamices de malla que permitan que el aire fluya a su través pero que retengan los polvos, es decir filtros de aproximadamente 1-100 mesh, preferentemente aproximadamente 2-50 mesh, con mayor preferencia aproximadamente 2.5-35 mesh, aún con mayor preferencia aproximadamente 3-20 mesh o aproximadamente 3.5-15 mesh, y con la máxima preferencia aproximadamente 4-6 mesh.

Después de la colocación dentro de la cámara del lecho fluidizado, el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo seco (o mezcla de estos) se somete después a la aglomeración al inyectar, preferentemente mediante el uso de una tobera de atomización en el aparato de lecho fluidizado, una cantidad definida y controlada de disolvente al polvo, para producir un polvo húmedo. Los disolventes preferidos son cualquier disolvente que es compatible con la formulación del medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador. Por "compatible" se entiende que el disolvente no induce cambios perjudiciales irreversibles en las características físicas o de desempeño del medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador, tales como descomposición o agregación de los componentes nutrientes del medio nutritivo o cambios en las características iónicas del amortiguador. Los disolventes particularmente preferidos son agua (más particularmente agua destilada y/o desionizada), suero (particularmente suero bovino o humano y más particularmente suero fetal bovino o suero de ternero), disolventes orgánicos (particularmente dimetilsulfóxido, acetona, etanol y similares), cualquiera de los cuales puede contener uno o más componentes adicionales (*por ejemplo*, sales, polisacáridos, iones, detergentes, estabilizadores, etc.).

Puede ser deseable o ventajoso incluir en el disolvente uno o más ingredientes que, debido a las concentraciones de los componentes requeridas en el producto final, no pueden incorporarse de forma óptima en el producto mediante otros métodos tales como trituración en molino de bolas. El componente puede disolverse, suspenderse, hacerse coloide o de cualquier otra manera introducirse en el disolvente a la concentración deseada, antes de usar el disolvente en la aglomeración del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo de la invención. Los

componentes que pueden incorporarse favorablemente al disolvente incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de los sueros descritos anteriormente, hormonas, citocinas, neurotransmisores, lípidos, factores de adhesión, proteínas, aminoácidos, vitaminas, cofactores enzimáticos, polisacáridos, sales, iones, amortiguadores y similares.

5 El disolvente debe introducirse en el polvo seco en un volumen que depende de la masa del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo que se va a aglomerar. Los volúmenes preferidos de disolvente por 10 500 gramos de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador son aproximadamente 5-100 ml, con mayor preferencia aproximadamente 10-50 ml, aún con mayor preferencia aproximadamente 25-50 ml, y con la máxima preferencia aproximadamente 35 ml. Las velocidades preferidas de introducción del disolvente por 15 500 gramos de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador son una velocidad de aproximadamente 1-10 ml/min, preferentemente aproximadamente 2-8 ml/min, con mayor preferencia aproximadamente 4-8 ml/min y con la máxima preferencia aproximadamente 6 ml/min. En algunas situaciones, puede ser deseable alternar entre adicionar disolvente por aproximadamente un minuto y después no adicionar disolvente por aproximadamente un minuto (lo que permite el secado del polvo dentro de la cámara del aparato), a fin de prevenir la floculación del polvo durante la aglomeración.

Una vez que la aglomeración del polvo está completa, como se evidencia por un tamaño de partícula más grande que el original, el polvo sin aglomerar y por la ausencia de partículas finas de arenilla en el polvo aglomerado, el polvo se seca completamente en el aparato. Las temperaturas del aparato preferidas para el secado del polvo aglomerado son 20 aproximadamente 50-80°C, con mayor preferencia aproximadamente 55-75°C, y con la máxima preferencia aproximadamente 60-65°C; el polvo se seca en el aparato preferentemente por aproximadamente 3-10 minutos y con la máxima preferencia por aproximadamente 5-7 minutos, por 500 gramos de polvo.

Además se describe un método comparativo donde los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo pueden prepararse mediante secado por atomización. Los medios nutritivos, suplementos de 25 medios, subgrupos de medios y amortiguadores en sus formas líquidas se colocan en un aparato de secado por atomización; estos líquidos se convierten después en sus polvos correspondientes al atomizar la solución en una cámara en el aparato bajo condiciones adecuadas para producir los polvos, tales como bajo temperatura y humedad controladas, hasta que se forman los polvos. En algunas situaciones, puede ser deseable o ventajoso secar por 30 atomización mezclas complejas de dos o más de los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y/o amortiguadores descritos anteriormente. Por ejemplo, medios nutritivos líquidos que contienen suero animal a una concentración deseada, o los componentes de los medios nutritivos líquidos que contienen suero animal a concentraciones deseadas, pueden mezclarse y después prepararse como polvos secados por atomización de acuerdo con los métodos descritos.

35 En un enfoque de secado por atomización típico, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores líquidos se aspiran al aparato y se atomizan en un aerosol con un atomizador de tipo giratorio o tobera. El aerosol líquido atomizado resultante se mezcla después con un gas (*por ejemplo*, nitrógeno o con mayor preferencia 40 aire) y se atomiza en la cámara de secado bajo condiciones suficientes para promover la producción de un producto en polvo. Estas condiciones pueden comprender el control electrónico de la temperatura y la humedad dentro de la cámara de tal manera que se promueva el secado final del producto. Bajo estas condiciones, el disolvente en el líquido se evapora de una manera controlada, lo que forma de esta manera partículas de flujo libre (*es decir*, polvo) de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores de la invención. Después el polvo se descarga de la cámara de secado, se pasa a través de uno o más filtros (tales como los tamices de malla descritos 45 anteriormente para la preparación en lecho fluidizado) y se recolecta para el procesamiento adicional (*por ejemplo*, empaque, esterilización, etc.). En algunas aplicaciones, particularmente cuando se producen polvos a partir de formulaciones sensibles al calor de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores, el aparato de secado por atomización puede combinarse con un aparato de lecho fluidizado integrado dentro de la cámara de secado, que permite la introducción de disolventes aglomerantes tales como los descritos anteriormente en 50 el polvo secado por atomización para producir medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo aglomerados secados por atomización.

Los aparatos para producir materiales particulados a partir de materiales líquidos mediante secado por atomización (con o sin tecnología de lecho fluidizado integrada) están disponibles comercialmente (*por ejemplo*, de Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland), y se describen, por ejemplo, en los folletos técnicos "Spray Drying", "Powdered 55 Pharmaceuticals by Spray Drying" y "Fresh Options in Drying" de Niro, Inc./Aeromatic-Fielder. De acuerdo con este fabricante, tales aparatos se han usado para preparar polvos de varios materiales, que incluyen productos lácteos, analgésicos, antibióticos, vacunas, vitaminas, levaduras, proteína vegetal, huevos, sustancias químicas, aromatizantes alimentarios y similares. Se ha encontrado que el secado por atomización es particularmente útil para la preparación de 60 suplementos de medios en polvo, tales como sueros y en particular los sueros descritos anteriormente, más particularmente sueros humano y bovino (tales como suero fetal bovino y suero de ternero).

En la práctica de este método comparativo, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios, amortiguadores o agentes de ajuste de pH líquidos deben atomizarse en la cámara a través del atomizador a una velocidad de atomización de aproximadamente 25-100 g/min, preferentemente a una velocidad de atomización de aproximadamente 30-90 g/min, 35-85 g/min, 40-80 g/min, 45-75 g/min, 50-75 g/min, 55-70 g/min, o 60-65 g/min, y con mayor preferencia a aproximadamente 65 g/min. La temperatura del aire de entrada en el atomizador se ajusta preferentemente a aproximadamente 100-300 °C, con mayor preferencia a aproximadamente 150-250 °C, y con la máxima preferencia a aproximadamente 200°C, con una temperatura de salida de aproximadamente 50-100°C, con mayor preferencia aproximadamente 60-80°C, y con la máxima preferencia aproximadamente 70°C. El flujo de aire en el atomizador se ajusta preferentemente a aproximadamente 50-100 kg/hr, con mayor preferencia aproximadamente 75-90 kg/hr, y con la máxima preferencia aproximadamente 80.0 kg/hr, a una presión de tobera de aproximadamente 1-5 bar, con mayor preferencia aproximadamente 2-3 bar, y con la máxima preferencia aproximadamente 2.0 bar. Se ha encontrado que estas condiciones y ajustes son preferibles en la presente invención para la producción de una variedad de polvos de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores mediante secado por atomización, particularmente para la producción de los sueros en polvo descritos anteriormente. Después del secado, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo secados por atomización pueden recolectarse en la cámara de secado a través de uno o más filtros, preferentemente tales como los descritos anteriormente para la tecnología de lecho fluidizado.

Después de esta preparación, los polvos preparados mediante los métodos de lecho fluidizado o secado por atomización descritos anteriormente tienen características físicas alteradas a partir de los polvos de partida o a partir de los medios, suplementos, subgrupos y amortiguadores en polvo preparados mediante la liofilización de los líquidos correspondientes. Por ejemplo, los polvos no procesados o liofilizados frecuentemente producen arenilla significativa cuando se usan, y se disuelven poco o lentamente en varios disolventes, mientras que los polvos aglomerados o secados por atomización están sustancialmente libres de arenilla y/o se disuelven rápidamente. Típicamente, los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo de la invención exhibirán reducción de arenilla y disolución más rápida que sus contrapartes en polvo preparadas mediante técnicas estándar tales como trituración en molino de bolas. En algunos polvos que están sustancialmente libres de arenilla pero que no pueden demostrar mejoría en la disolución, los polvos pueden disolverse rápidamente mediante la solvatación mecánica rápida del polvo, tal como mediante el uso de un impulsor mecánico, o al proporcionar primero un vapor del disolvente sobre el polvo tal como mediante solvatación por atomización.

Los enfoques de secado por atomización y aglomeración descritos anteriormente pueden combinarse para producir polvos de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio y amortiguador aglomerados secados por atomización. Un medio, suplemento, subgrupo o amortiguador en polvo que se ha preparado mediante secado por atomización puede, luego de secarse por atomización, aglomerarse después con un disolvente (tal como los descritos anteriormente) para mejorar adicionalmente las características físicas y de desempeño del medio, suplemento, subgrupo o amortiguador resultante. Por ejemplo, un suero animal en polvo puede prepararse al secar por atomización el suero animal líquido como se describió anteriormente, y este polvo de suero secado por atomización puede mezclarse después con medios nutritivos en polvo seco (preparados mediante secado por atomización o mediante técnicas estándar tales como trituración en molino de bolas); este polvo mezclado puede aglomerarse después como se describió anteriormente. Alternativamente, un polvo de medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador secado por atomización puede aglomerarse como anteriormente, para mejorar las propiedades de disolución del polvo. Este enfoque puede ser particularmente ventajoso cuando se secan por atomización líquidos con bajo contenido de sólidos (aproximadamente 1-10%), tales como sueros animales líquidos. Como apreciará el experto, estos enfoques facilitarán la preparación de un gran lote de uno o más componentes (*por ejemplo*, sueros u otros suplementos de medios) para usar como una reserva para la adición a un medio, suplemento, subgrupo o amortiguador en polvo a una concentración deseada, mientras que además se obtienen los beneficios de la aglomeración descritos anteriormente. Además, este enfoque puede reducir la variabilidad entre lotes que puede ser un problema con ciertos suplementos de medios (particularmente sueros animales)

Los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo aglomerados o secados por atomización preparados como se describió anteriormente pueden empacarse después, por ejemplo, en envases tales como viales, tubos, botellas, bolsas, bolsitas, cajas, cajas de cartón, bidones y similares, antes o después de la esterilización como se describe más abajo. Los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo pueden empacarse en una forma compacta, empacada al vacío, tal como la que se conoce en la técnica como un "paquete de ladrillo" en donde el polvo se empa en un envase flexible (tal como una bolsa o una bolsita) que se sella mientras se evacúa. Tales empaques pueden comprender favorablemente uno o más puertos de acceso (tales como válvulas, puertos de tipo luer, etc.) lo que permite la introducción de un disolvente (*por ejemplo*, agua, sueros, medios u otros disolventes o soluciones acuosas u orgánicas) directamente en el empaque para facilitar la disolución rápida del polvo. El empaque puede comprender dos o más compartimientos adyacentes, uno o más de los cuales puede contener uno o más de los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en

5 polvo seco de la invención y uno o más de otros de los que pueden contener uno o más disolventes acuosos u orgánicos que deben ser estériles. Después el polvo seco puede disolverse simplemente al eliminar o romper la barrera entre los compartimientos, de forma ideal sin pérdida de esterilidad, para permitir el mezclado del polvo y el disolvente de tal manera que el polvo se disuelve y produce un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador estéril a una concentración deseada.

10 Los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores empacados se almacenan preferentemente por períodos de tiempo prolongados, y a las temperaturas, señaladas anteriormente, típicamente por aproximadamente 1-24 meses a temperaturas de menos de aproximadamente 30°C, con mayor preferencia a
15 temperaturas de menos de aproximadamente 20-25°C, hasta su uso. A diferencia de los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo tradicionales, el almacenamiento a temperaturas reducidas *por ejemplo*, 0-4°C) no es necesario para el mantenimiento de las características de desempeño de los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores preparados mediante los presentes métodos. Por supuesto, pueden requerirse otras temperaturas de almacenamiento cuando los empaques comprenden además
20 compartimientos separados que contienen uno o más disolventes; en estos casos, las condiciones de almacenamiento óptimas estarán dictadas por los requisitos de almacenamiento del(de los) disolvente(s) lo que será conocido para el técnico con experiencia.

Esterilización y Empaque

20 La descripción proporciona además métodos para esterilizar los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores de la invención o descripción, así como también para esterilizar medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo preparados mediante métodos estándar tales como trituración en molino de bolas o liofilización. Dado que los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos
25 de medios y amortiguadores se preparan usualmente en soluciones de gran volumen y frecuentemente contienen componentes lábiles al calor, no son susceptibles a la esterilización por irradiación o por calentamiento. Por lo tanto, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores se esterilizan comúnmente mediante métodos de eliminación de contaminantes tales como filtración, que aumenta de forma significativa el gasto y el tiempo requerido para fabricar tales medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores.

30 Los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo preparados de acuerdo con los métodos de la descripción (*por ejemplo*, mediante secado por atomización de medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores líquidos, o mediante aglomeración de los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo), o mediante métodos estándar tales como trituración en molino de
35 bolas (de los componentes en polvo) o liofilización (de las formas líquidas de los medios, suplementos, subgrupos o amortiguadores), sin embargo, pueden esterilizarse mediante métodos menos caros y más eficientes. Por ejemplo, medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo (preparados como se describió anteriormente mediante secado por atomización o liofilización de una forma líquida, o mediante aglomeración de una forma en polvo, de los medios, suplementos, subgrupos o amortiguadores) pueden irradiarse bajo condiciones que favorecen la esterilización de estos polvos. Preferentemente, esta irradiación se realiza a granel (*es decir*, después
40 de empacar el medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador), y con la máxima preferencia esta irradiación se realiza mediante la exposición del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador de la invención a granel empacados a una fuente de rayos gamma bajo condiciones tales que se inactivan (*es decir*, se previene la replicación de) las bacterias, hongos, esporas o virus que pueden residir en los medios, suplementos de
45 medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo. Alternativamente, la irradiación puede realizarse mediante la exposición del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en polvo, antes del empaque, a una fuente de rayos gamma o una fuente de luz ultravioleta. Los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores de la invención pueden esterilizarse alternativamente mediante tratamiento térmico (si los subgrupos del medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador son estables al calor), por ejemplo mediante
50 pasteurización rápida o esterilización en autoclave. Como entenderá el experto en la técnica, la dosis de irradiación o calor, y el tiempo de exposición, requeridos para la esterilización depende del volumen de los materiales que se van a esterilizar.

Los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo a granel pueden exponerse a una fuente de irradiación γ a una dosificación total de aproximadamente 10-100 kilograys (kGy),
55 preferentemente una dosificación total de aproximadamente 15-75 kGy, 15-50 kGy, 15-40 kGy o 20-40 kGy, con mayor preferencia una dosificación total de aproximadamente 20-30 kGy, y con la máxima preferencia una dosificación total de aproximadamente 25 kGy, por aproximadamente 1 hora a aproximadamente 7 días, con mayor preferencia aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 días, 1 hora a aproximadamente 3 días, aproximadamente 1-24 horas o
60 aproximadamente 1-5 horas, y con la máxima preferencia aproximadamente 1-3 horas ("tasa de dosis normal"). Alternativamente, los polvos a granel de la invención pueden esterilizarse a una "tasa de dosis lenta" de una dosificación total de aproximadamente 25-100 kGy por un período de aproximadamente 1-5 días. Durante la irradiación, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en polvo se almacenan preferentemente a

una temperatura de aproximadamente -70°C a aproximadamente temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C), con la máxima preferencia a aproximadamente -70°C. El experto apreciará, por supuesto, que la dosis de radiación y los tiempos de exposición pueden ajustarse en dependencia del volumen y/o masa de material que se va a irradiar; las dosificaciones de irradiación óptimas típicas, los tiempos de exposición y temperaturas de almacenamiento requeridos para la esterilización de materiales en polvo a granel mediante irradiación o tratamiento térmico son bien conocidos en la técnica.

Después de la esterilización, los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores sin empacar pueden empacarse bajo condiciones asépticas, por ejemplo al empacar los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores en envases tales como tubos estériles, viales, botellas, bolsas, bolsitas, cajas, cajas de cartón, bidones y similares, o en el empaque al vacío o el empaque polvo/disolvente integrado descrito anteriormente. Los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores empacados estériles pueden almacenarse después por períodos de tiempo prolongados como se describió anteriormente.

Uso de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores

Por lo tanto, la presente invención proporciona medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo que son fácilmente solubles en un disolvente rehidratante y que están sustancialmente libres de arenilla. Para su uso, el medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador aglomerado puede hidratarse (o "reconstituirse") en un volumen de un disolvente suficiente para producir las condiciones de nutrientes, de electrolitos, iónicas y de pH requeridas para el uso particular del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador solvatado. Esta reconstitución se facilita particularmente en la presente invención, dado que los presentes medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores se disolverán rápidamente y producirán poca o ninguna arenilla o material insoluble, a diferencia de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores liofilizados o triturados en molino de bolas.

Los disolventes preferidos para su uso en la reconstitución de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores en polvo de la invención incluyen, pero sin limitarse a, agua (más particularmente agua destilada y/o desionizada), suero (particularmente suero bovino o humano y más particularmente suero fetal bovino o suero de ternero), disolventes orgánicos (particularmente dimetilsulfóxido, acetona, etanol y similares), o cualquier combinación de estos, cualquiera de los cuales puede contener uno o más componentes adicionales (*por ejemplo*, sales, polisacáridos, iones, detergentes, estabilizadores, etc.). Por ejemplo, los suplementos de medios (tales como sueros animales) y los amortiguadores en polvo se reconstituyen preferentemente en agua a una concentración final 1X, u opcionalmente una concentración más elevada (*por ejemplo*, 2X, 2.5X, 5X, 10X, 20X, 25X, 50X, 100X, 500X, 1000X, etc.) para la preparación de soluciones de reserva o para almacenamiento. Alternativamente, los medios de cultivo en polvo pueden reconstituirse en una solución de suplementos de medios (*por ejemplo*, sueros tales como FBS) en agua, tales como aquellas soluciones en donde el suplemento de medio está presente a una concentración, por ejemplo, de 0.5%, 1%, 2%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, o más elevada, vol/vol en el agua.

La reconstitución de los medios nutritivos en polvo, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores se realiza preferentemente bajo condiciones asépticas para mantener la esterilidad del medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador reconstituido, aunque el medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador reconstituido puede esterilizarse alternativamente, preferentemente mediante filtración u otros métodos de esterilización que son bien conocidos en la técnica, después de la rehidratación. Después de su reconstitución, los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores deben almacenarse a temperaturas más abajo de aproximadamente 10°C, preferentemente a temperaturas de aproximadamente 0-4°C, hasta su uso.

Los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores reconstituidos pueden usarse para cultivar células de acuerdo con las técnicas estándar de cultivo celular que son bien conocidas para un experto en la técnica. En tales técnicas, las células que se van a cultivar se contactan con el medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador reconstituido de la invención bajo condiciones que favorecen el cultivo de las células (tales como temperatura, humedad, iluminación y condiciones atmosféricas controladas). Las células que son particularmente susceptibles al cultivo mediante tales métodos incluyen, pero sin limitarse a, células bacterianas, células de levadura, células vegetales y células animales. Tales células bacterianas, células de levadura, células vegetales y células animales están disponibles comercialmente a partir de depósitos de cultivo, *por ejemplo*, la Colección americana de cultivos tipo (Rockville, Maryland), Invitrogen (La Jolla, California) y otros que serán familiares a un experto en la técnica. Las células animales preferidas para el cultivo mediante estos métodos incluyen, pero sin limitarse a, células de insecto (con la máxima preferencia células de *Drosophila*, células de *Spodoptera* y células de *Trichoplusia*), células de nemátodos (con la máxima preferencia células de *C. elegans*) y células de mamífero (que incluyen pero sin limitarse a células CHO, células COS, células VERO, células BHK, células AE-1, células SP2/0, células L5.1, células de hibridoma y con la máxima preferencia células humanas tales como células 293, células PER-C6 y células HeLa), cualquiera de las cuales puede ser una célula somáticas, una célula germinal, una célula normal, una célula enferma, una célula

transformada, una célula mutante, una célula madre, una célula precursora o una célula embrionaria, y cualquiera de las cuales puede ser una célula dependiente de anclaje (es decir, "suspensión") o independiente de anclaje.

Células

La descripción se refiere además a métodos para producir composiciones en polvo de células secas que comprenden una o más células, y secar los polvos de células producidos mediante estos métodos. Estos métodos por lo tanto producen composiciones que contienen células en donde las células se preservan y pueden almacenarse por períodos de tiempo prolongados hasta su uso. De esta manera, los métodos superan algunos de los inconvenientes de los métodos tradicionales de preservación de células (*por ejemplo*, congelación) tales como la necesidad de equipos de criopreservación y el uso de ciertos criopreservantes que pueden ser tóxicos para las células.

Estos métodos pueden comprender una o más etapas. Por ejemplo, un método tal de la descripción puede comprender obtener una o más células que van a secarse, formar una suspensión celular acuosa al suspender la una o más células en una solución acuosa, y secar por atomización la suspensión celular bajo condiciones que favorecen la producción de un polvo seco. Estos métodos pueden comprender adicionalmente contactar la una o más células con uno o más compuestos estabilizantes o preservantes (*por ejemplo*, un polisacárido, que incluye pero sin limitarse a trehalosa). La solución acuosa usada para formar la suspensión celular comprende preferentemente uno o más componentes, tales como uno o más de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios, sales o amortiguadores descritos anteriormente. Preferentemente, la solución acuosa usada para formar la suspensión celular se ajusta a tonicidad y osmolalidad óptimas o sustancialmente óptimas para el tipo celular que se seca. La solución acuosa puede comprender opcionalmente uno o más componentes adicionales, tales como uno o más polisacáridos, iones, detergentes, compuestos estabilizantes o preservantes (que incluyen trehalosa), y similares. Cuando la una o más células contactan con uno o más compuestos estabilizantes o preservantes, los compuestos estabilizantes o preservantes pueden incorporarse a la solución acuosa usada para formar la suspensión celular acuosa. Alternativamente, los compuestos estabilizantes o preservantes pueden atomizarse o aglomerarse en el polvo de células secas luego de la formación del polvo.

Una vez que el polvo de células secas se ha formado mediante los métodos descritos anteriormente, el polvo puede aglomerarse opcionalmente con un disolvente de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para la aglomeración de polvo secos. Cualquier disolvente que es compatible con el tipo celular que se seca puede usarse para aglomerar el polvo de células secas, que incluyen pero sin limitarse a agua, una solución de medio nutritivo, una solución de suplemento de medio nutritivo (que incluye sueros, particularmente suero bovino (más particularmente suero fetal bovino y de ternero) y suero humano), una solución amortiguadora, una solución salina, y combinaciones de estos.

Una variedad de células puede secarse de acuerdo con los métodos descritos que incluyen células procariotas (*por ejemplo*, bacterianas) y eucariotas (*por ejemplo*, fúngicas (especialmente levadura), animales (especialmente de mamífero, que incluyen humanas) y vegetales), particularmente las células, tejidos, órganos, sistemas de órganos, y organismos descritos anteriormente. Una vez que se producen las células secas, pueden empacarse asépticamente y almacenarse por períodos de tiempo prolongados (*por ejemplo*, varios meses a varios años), preferentemente a temperaturas de aproximadamente 0-30°C, 4-25°C, 10-25°C, o 20-25°C (*es decir*, "temperatura ambiente") hasta su uso. Para su uso en la preparación de cultivos de células viables, el polvo de células secas puede reconstituirse de asépticamente, en una suspensión celular que comprende una o más células viables, con un disolvente acuoso (*por ejemplo*, agua estéril, soluciones amortiguadoras, suplementos de medios, medios de cultivo, o combinaciones de estos) y cultivarse de acuerdo con protocolos estándar conocidos en la técnica. Alternativamente, el polvo de células secas puede reconstituirse en una suspensión celular donde la viabilidad celular no es esencial, por ejemplo para la preparación de un inmunógeno que va a usarse para la inmunización de un animal. En tales casos, el polvo de células secas puede reconstituirse con cualquier disolvente que es compatible con los protocolos de inmunización estándar, tales como disolventes acuosos u orgánicos que pueden comprender uno o más detergentes, adyuvantes, etc.

Estuches

Los medios, suplementos de medios, subgrupos de medios, amortiguadores y células en polvo seco proporcionados por la invención se adecuan de forma ideal para la preparación de los estuches. Tal estuche puede comprender uno o más envases tales como viales, tubos de prueba, botellas, empaques, bolsitas, bidones, y similares. Cada uno de los envases puede contener uno o más de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores de la invención descritos anteriormente, o combinaciones de estos. Tales medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores pueden hidratarse o deshidratarse pero son típicamente preparaciones deshidratadas producidas mediante los métodos de la invención. Tales preparaciones pueden, de acuerdo con la invención, ser estériles.

Un primer envase puede contener, por ejemplo, un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o un

amortiguador de la invención, o cualquier componente o subgrupo de estos, tales como cualquiera de los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores de la invención que se describen anteriormente. Los medios nutritivos, amortiguadores, extractos, suplementos, componentes o subgrupos adicionales pueden estar contenidos en envases adicionales en los estuches presentes. Los estuches pueden contener además, en uno o más envases adicionales, una o más células tales como las células bacterianas, células de levadura, células vegetales o células animales descritas anteriormente. Tales células pueden liofilizarse, secarse, congelarse o preservarse de cualquier otra manera, o pueden secarse por atomización de acuerdo con los métodos de la descripción. Además, los estuches de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más envases adicionales, que contienen, por ejemplo, L-glutamina, opcionalmente en complejo con uno o más cationes divalentes (*ver* patente de los Estados Unidos núm. 5,474,931). Los estuches pueden comprender adicionalmente uno o más envases adicionales que contienen un disolvente para usarse en reconstituir los medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios y/o amortiguadores en polvo seco; tales disolventes pueden ser acuosos (que incluyen soluciones amortiguadoras, soluciones salinas, soluciones de medio nutritivo, soluciones de suplemento de medio nutritivo (que incluyen sueros tales como sueros bovinos (particularmente suero fetal bovino o suero de ternero) o suero humano), o combinaciones de estos) u orgánicos. Otros ingredientes que no son compatibles para la mezcla con los medios nutritivos, amortiguadores, extractos, suplementos, componentes o subgrupos de la invención pueden contenerse en uno o más envases adicionales para evitar la mezcla de los componentes incompatibles.

El número y los tipos de envases contenidos en un estuche dado para hacer un medio nutritivo, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador pueden variar en dependencia del tipo de medio, suplemento de medio, subgrupos de medio o amortiguador que va a prepararse. Típicamente, el estuche puede contener los envases respectivos que contienen los componentes o suplementos necesarios para hacer un medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador en particular. Sin embargo, los envases adicionales pueden incluirse en el estuche de la invención de tal manera que los diferentes medios, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores puedan prepararse mediante el mezclado de diferentes cantidades de varios componentes, suplementos, subgrupos, amortiguadores, disolventes, etc., para hacer diferentes formulaciones de medio, suplemento de medio, subgrupo de medio o amortiguador.

Ventajas

Inesperadamente, la presente invención proporciona la preparación de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios, amortiguadores y células a costo reducido. Las reducciones del costo se deben a varios factores. Por ejemplo, las formulaciones de medio, suplemento de medio, subgrupo de medio y amortiguador de la presente invención pueden producirse con instalaciones de producción mucho menores dado que no se requieren grandes tanques de agitación para formulaciones 1X. Además, las formulaciones de medio, suplemento de medio, subgrupo de medio y amortiguador de la presente invención pueden prepararse sobre la base de según se necesite mediante el uso de técnicas de producción "justo a tiempo" las que reducen los costos de inventario, de almacenamiento y laborales. El tiempo requerido para la preparación y envío de las formulaciones de medio, suplemento de medio, subgrupo de medio y amortiguador puede reducirse de 6-8 semanas a tan poco como un día. Los medios de ajuste automático del pH de la invención proporcionan además ahorros significativos de costo y tiempo, y reducen la tendencia de la introducción de contaminación en medios reconstituidos que puede ocurrir durante el proceso de ajuste de pH de acuerdo con los métodos estándar mediante el uso de medios tradicionales en polvo seco o líquidos a granel. La presente invención permite además la preparación de componentes de medios nutritivos, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores los que pueden usarse para preparar cantidades muy grandes de medios 1X, suplementos de medios, subgrupos de medios o amortiguadores (*por ejemplo*, 100,000 litros o más) que requerirían solo una prueba de control de calidad comparado con múltiples pruebas de control de calidad para múltiples lotes producidos de acuerdo con otras técnicas usadas comúnmente. De forma importante, las formulaciones de medios, suplementos de medios, subgrupos de medios y amortiguadores de la presente invención son más consistentes entre lotes dado que los componentes individuales son más estables.

Habiendo descrito en detalle la presente invención, la misma se comprenderá de forma más clara con referencia a los siguientes ejemplos y los ejemplos comparativos, los que se incluyen en la presente sólo con propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes de la invención.

Ejemplo 1: Aglomeración de Medios en Polvo Seco (DPM) típicos

1. Con un aparato de lecho fluidizado de mesa de laboratorio (Stera-1; Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland): Colocar 100-500 g de DPM dentro de la cámara. Colocar sobre el aparato y usar la palanca para sellar la unidad.
2. Iniciar el flujo de aire para fluidizar (levitar) el DPM. Dado que el DPM tradicional es de tamaño de partícula relativamente fino, se necesitarán las posiciones 4-6. Encender el dispositivo de vacío para capturar las partículas finas

de DPM, que pasan a través de los filtros superiores. Asegurar que el polvo fluidizado esté aproximadamente en el centro dentro de la cámara con respecto al tamiz de malla inferior y los filtros superiores.

3. Encender el dispositivo de inyección (unidad atomizadora) conectando primero la línea de aire comprimido y después encendiendo la bomba que está conectada a una fuente de agua. El objetivo es admitir ~6 ml de agua por minuto (debe conocerse el régimen de flujo para cualquier bomba dada basado en RPM y el diámetro de la tubería). Con el objetivo de prevenir la floculación de DPM, adicionar alternativamente agua por ~1 minuto y después parar por ~1 minuto, lo que permite que ocurra el secado en la cámara.

4. Si los filtros se recubren con DPM durante la corrida de manera que el retroceso no desprenda el polvo, cambiar la velocidad del ventilador hasta las posiciones 2-3 hasta que todos los filtros se aclaren. Después, aumentar la velocidad de corrida del ventilador al nivel previo.

5. La aglomeración se completará cuando se añadan ~35 ml de agua por cada 500 g de DPM. Este volumen variará en dependencia de la formulación de DPM. Se observará un flujo descendente de gránulos aglomerados relativamente grandes en la cámara (fondo) hacia el final de la corrida. Las partículas grandes visibles y la ausencia de arenilla fina indican que el proceso está completo.

6. Dejar secar completamente el DPM aglomerado por 5-7 minutos.

7. Al final de la corrida, vaciar los filtros 4 veces.

8. Apagar la unidad, desconectar el tubo de agua y recolectar el DPM aglomerado en un envase hermético.

Estos enfoques deben ajustarse cuando se usa un aparato de lecho fluidizado a escala de proceso o escala de producción. Por ejemplo, cuando se usa el aparato MP-1 (Niro, Inc./Aeromatic-Felder; Columbia, Maryland), el siguiente protocolo produce resultados satisfactorios:

1. Sellar la unidad (inflar las juntas).

2. Encender el ventilador para precalentar.

3. Detener el ventilador cuando la temperatura del aire de entrada iguale el punto de ajuste.

4. Desinflar las juntas, cargar el material, inflar las juntas.

Las etapas 5-8 deberán realizarse dentro de un minuto:

5. Iniciar el lote.

6. Encender el ventilador, y encender el limpiador del filtro.

7. Ajustar el % de presión de aire de atomización de la tobera a la salida (comprobar la tobera para el vacío).

8. Conectar la línea de alimentación del líquido,

9. Encender la bomba sobre la pantalla y en la bomba.

10. Reajustar el tiempo del lote

11. Atomizar todo el líquido a la tasa fijada (26g/min). Usar ~ 250ml de agua por 2 kg de polvo.

12. Detener la bomba en la bomba y en la pantalla cuando se adiciona todo el líquido.

13. Reducir el flujo de aire a valores de secado (por ejemplo de 100 a 60).

14. Cuando el producto alcanza la temperatura deseada (~40°C), ir a la pantalla de "ajuste inicial" y ajustar la "duración del lote" por un valor de 2-3 minutos más que el presente "tiempo de lote".

15. Detener el lote.

16. Desinflar las juntas.

Ajustes típicos del instrumento (para aparatos a escala de mesa, de proceso y de producción):

Temperatura de secado: 60-65°C

Temperatura del aire de salida: ~33°C

Presión de vaciado: 5 bar

Presión de atomización: 1.5-2.0 bar

Intervalo de retroceso: 1 después de la atomización, 2 durante la atomización

Capacidad del ventilador: 5 al inicio de la corrida, 6 después que la aglomeración es evidente.

Magnahelics: Resistencia del filtro de 150-250, Resistencia de la placa de control perforada ~50, Volumen de aire: menor que 50.

Ejemplo 2: Adición de Bicarbonato de Sodio como una Parte Integral de DPM

Como se señaló anteriormente, el bicarbonato de sodio no se adiciona típicamente al DPM durante la fabricación mediante la trituration en molino de bolas o liofilización, debido a las complicaciones potenciales de la capacidad amortiguadora y de liberación de gases encontradas tras el almacenamiento de los medios pulverizados. Este proceso estándar de producción necesita por lo tanto la adición de bicarbonato de sodio, y el ajuste del pH, tras la reconstitución de los medios. Con los presentes métodos, sin embargo, estas etapas adicionales pueden obviarse al adicionar bicarbonato de sodio (o cualquier sal amortiguadora) directamente a los medios en polvo durante la fabricación.

Hay dos vías para incluir el bicarbonato de sodio (o cualquier sal amortiguadora) dentro del DPM: (a) a través del dispositivo de inyección y (b) como parte del DPM.

(a) Dispositivo de Inyección

Debido a la solubilidad del bicarbonato de sodio y las cantidades que generalmente necesitan adicionarse a un medio de cultivo celular típico de mamífero, se necesitaría inyectar volúmenes de líquido bastante grandes en el polvo (significativamente mayores que los 35 ml de agua mencionados anteriormente). Esto es posible y de hecho puede preferirse si se adiciona otro componente que requiere de forma similar un volumen relativamente grande de líquido con el objetivo de adicionarse al DPM, como es el caso con suero, por ejemplo. En este caso, debe tenerse cuidado de adicionar el líquido secuencialmente, dejar secar etc. un número de veces para asegurar que el DPM no flocule dentro del dispositivo. Es aproximadamente correcto el uso de 6 ml por minuto por -1 minuto y después dejar secar por otros 2 minutos.

La cantidad de líquido a adicionar se determina como sigue: Preparar bicarbonato de sodio a 75 g/L en agua. Ejemplo: 250 g de DPM en la cámara para ser aglomerado. Asumir que se requieren 10.0 g de DPM para 1 L de medio líquido 1X. Por ello, 250 g representan 25 L de medio líquido 1X. Para cada L de líquido, asumir (por ejemplo) un requerimiento de 2 g de bicarbonato de sodio. Esto significa que se necesitan 50 g de bicarbonato. Ahora, dado que la solución de bicarbonato está a 75 g/L, deben adicionarse entonces 0.67 L de solución de bicarbonato a los 250 g de DPM.

La solución de bicarbonato de sodio se adicionaría de forma similar al proceso para "aglomeración de un DPM típico" anterior *excepto* que se necesita un tiempo de secado más largo entre ciclos dado que el pH de la solución de bicarbonato de sodio es ~8.00 el que puede degradar los componentes de los medios. Es importante que el polvo nunca se "empape" por la adición de la solución de bicarbonato de forma demasiado rápida sin permitir el tiempo suficiente para el secado completo del polvo de bicarbonato entre los ciclos. Además, se requieren tiempos más largos de secado del fluido dado que esto es importante para tener un contenido de humedad final tan bajo como sea posible ya que la humedad resultaría en la liberación de gas de dióxido de carbono que resulta en la pérdida de la capacidad amortiguadora y la formación de "almohada" si el polvo está en un paquete de papel de aluminio.

(b) Como parte del DPM

El bicarbonato de sodio puede molerse en el DPM de un modo similar como para otros componentes de medios antes del tratamiento en lecho fluidizado. Sin embargo, en el proceso de molienda, el bicarbonato debe adicionarse como el componente final. Todos los demás componentes de los medios deben molerse de manera usual y después el molino se detiene y por último se adiciona el bicarbonato, con molienda adicional para alcanzar las partículas de tamaño apropiado. Es importante que todo el procesamiento después de la molienda (colocación en envases, etc.) se haga en un medio ambiente con humedad controlada ajustado tan bajo como sea posible operacionalmente (~20-40%. El procesamiento en lecho fluidizado debe realizarse después tan pronto como sea posible luego de la molienda. (Si no se procesa el mismo día, el DPM debe envolverse doblemente y colocarse dentro de un envase sellado con absorbentes de humedad.)

El proceso en lecho fluidizado en sí se realiza de forma similar al ejemplo dado anteriormente (con el uso de 35 ml por 500 g de DPM) excepto que los tiempos de secado luego de la inyección con agua (-6 ml/min) deberían extenderse de nuevo: 1 min de inyección de agua y 2 minutos de ciclos de secado. Se notará que el color del DPM será rojo profundo-púrpura ligero debido a la presencia de rojo de fenol. Dado que el DPM prácticamente no tiene contenido de humedad, esto no representa una situación de degradación, y es porque el procesamiento en lecho fluidizado es esencial.

Ejemplo 3: DPM que incluye sales amortiguadoras (por ejemplo, bicarbonato de sodio) y se formula de manera que el pH del medio (1X) reconstituido tiene automáticamente el pH deseado sin esfuerzos del usuario

Como se señaló anteriormente, todos los medios de cultivo celular de mamíferos disponibles comercialmente requieren la adición de una o más sales amortiguadoras (*por ejemplo*, bicarbonato de sodio) cuando se prepara el líquido 1X, y después el ajuste del pH, de manera que la solución esté a un pH adecuado. Los presentes métodos, sin embargo, pueden usarse para obviar la adición de bicarbonato de sodio (como se describió anteriormente en el Ejemplo 2) y la necesidad del ajuste del pH. En este aspecto de la invención la tecnología de lecho fluidizado se usa para introducir un ácido o una base (en dependencia de la necesidad) a un medio en polvo seco que comprende una o más sales amortiguadoras. De acuerdo con este aspecto de la invención, cualquiera de las sales amortiguadoras o combinaciones de estas, y cualquier ácido o base, puede usarse en dependencia del pH deseado y la capacidad amortiguadora en el medio final de cultivo celular reconstituido.

Si el bicarbonato de sodio se adiciona directamente al DPM como un polvo, es posible que el usuario final adicione

5 simplemente agua y mezcle para obtener una solución que ya contiene bicarbonato (ver anteriormente) y de un pH apropiado. Es necesario primero determinar cuánto ajuste de pH se requiere. (1) Colocar 1 L de agua en un vaso de precipitado. Adicionar DPM al líquido y mezclar. (La cantidad a adicionar/L está dada por las especificaciones para este polvo, por ejemplo, 10 g/L, 13 g/L). En este caso, el peso del bicarbonato de sodio debe considerarse además en la determinación de cuánto adicionar por litro. (2) Después que el polvo se disuelve, adicionar HCl 5N para ajustar la solución al pH deseado. Registrar la cantidad. (3) Convertir este número a cantidades de HCl 1N. Calcular cuánto HCl 1N se necesita para el ajuste del polvo total a aglomerar. (Ejemplo: se necesitan 5 ml de HCl 1N para ajustar 1 L de medio A 1X a pH 7.2 a partir de un pH sin ajustar de 7.9. Ese 1 L de medio 1X representa, por ejemplo, 13.0 g de DPM. Por lo tanto, por cada 13.0 g de DPM, se necesitan 5 ml de HCl 1N. Si se desea ajustar el pH de 250 g de DPM, entonces es necesario adicionar 250 dividido por 13.0= 19.2 x 5ml o 96 ml de HCl 1N al polvo para hacerlo de pH automáticamente ajustado.

15 Este HCl 1N debe adicionarse ahora al DPM. La mejor vía para esto es usar el dispositivo de inyección, que adiciona HCl 1N en vez de agua. Generalmente, el protocolo es similar al anterior con las siguientes excepciones: (1) el HCl 1N debe adicionarse lentamente al medio que contiene bicarbonato de sodio. Si se adiciona demasiado rápido, el dióxido de carbono puede ser expulsado, lo que resulta en una capacidad amortiguadora poco óptima. Debido al volumen de HCl 1N requerido generalmente, se necesitan varios ciclos de 1 minuto encendido, 2 minutos apagado. Al final de cada ciclo debe obtenerse un estado en polvo seco de manera que exista un sistema dinámico en donde el DPM tenga características de un proceso fluidizado pero en realidad sea un polvo (Increíblemente, a medida que el HCl se adiciona al polvo, el color masivo cambia de púrpura rojizo oscuro a color naranja amarillo claro incluso a pesar de que el polvo permanece prácticamente seco en todo momento debido a la evaporación continua dentro del sistema). Dado que la cantidad total de HCl se calcula para obtener un pH prácticamente neutro, el polvo en realidad nunca se expone a condiciones "ácidas" siempre que el lecho fluidizado se ajuste apropiadamente (ver anteriormente; la posición de las partículas de polvo dentro de la cámara durante la operación). Es importante asegurar que el polvo esté en movimiento a través del sistema (es decir, que se levante, se aglomere y se asiente continuamente) y que no tenga zonas "muertas" dentro de la cámara.

30 Una vez que el polvo se recolecta después de la corrida, este puede adicionarse al agua y reconstituirse en cualquier momento siempre que se mantenga en empaque "seco" y lactancia. No se necesita el ajuste del pH. Por lo tanto, la invención proporciona un medio en polvo seco de pH automáticamente ajustado, en donde el pH del medio líquido producido mediante la reconstitución del medio en polvo seco no requiere ajuste de pH.

35 ***Ejemplo 4: Inclusión de los suplementos de gran peso molecular tales como suero, albúmina, Hy-Soy, etc., dentro del propio DPM***

Hasta este momento, los medios en polvo seco que contienen suero no se encuentran disponibles comercialmente. Mediante el uso de los presentes métodos (a través de las tecnologías de lecho fluidizado y de secado por atomización), se tuvo éxito en la adición de suero a un polvo de una manera donde se mantiene la funcionalidad (cultivo celular).

40 El dispositivo de inyección del aparato de lecho fluidizado es capaz de formar un vapor con suero, y la albúmina concentrada. Se intentó ver si el suero adicionado al DPM y secado de esta manera podría ser funcional.

45 Procedimiento para la adición de suero: (1) Determinar el peso del DPM estándar que va a aglomerarse. (2) A partir de esto, basado en los g/L para el polvo en particular, calcular el volumen del medio 1X que hará el g de polvo. (3) Calcular el volumen de suero que se necesitaría en un nivel de porcentaje de suplementación dado (*por ejemplo*, 100 g de polvo a usarse en 10 g/L produce 10 L equivalentes de polvo). En una suplementación al 5% de suero, se requerirían 500 ml de suero para adicionar mediante el dispositivo de inyección.

50 Protocolo para la adición del suero: El suero y la albúmina son muy viscosos, el patrón de atomización de la tobera debe verificarse para el tamaño y el patrón de la gotita. Con el tubo de muestra en la solución a adicionar al polvo, probar la atomización contra un cartón u otro fondo. Verificar la uniformidad y el tamaño pequeño de la gotita. Si no hay un "vapor", aumentar la presión de atomización en 0.5 bar y probar de nuevo. Hacer esto hasta que la presión suficiente resulte en un patrón fino de vapor.

55 Para usar en aplicaciones de cultivo celular, es necesario conocer el peso/ml de suero-DPM que va a usarse por L de medio 1 X. Para hacer esto, pesar con exactitud los viales o tubos de prueba que contendrán el suero durante el secado. Colocar una cantidad constante (conocida) de suero en cada uno de los viales. Después colocar los viales en un Speed Vac o liofilizadora. Remover el agua hasta la sequedad. Después, pesar los viales de nuevo, que contienen esta vez el suero liofilizado. Calcular el peso del suero y expresarlo por ml del volumen original. El peso del DPM aglomerado con suero para usar por L, será entonces el peso "de uso" del DPM estándar más el peso del suero a un nivel dado.

Por ejemplo, se asume que el Medio A (DPM) va a usarse a 10 g/l, la suplementación de suero debe estar al 5% v/v. Esto significa que además del peso del DPM estándar, el peso del suero sería igual 5% = 50 ml a adicionar por L de medio. Asumir que el polvo de suero pesa 0,06 g/ml. Entonces el peso de suero en polvo = $50 \times 0.06 \text{ g/L} = 3 \text{ g}$. Por ello, el peso del DPM que contiene suero que se adicionaría a 1 L de agua es el peso de polvo de suero (3 g) más el peso del DPM estándar (10 g) por litro = 13 g/L.

Ejemplo 5: Reducción o eliminación de técnicas de molienda (sistema de entrada de alta energía que descompone los componentes hasta partículas de tamaño en micras) cuando se fabrica un DPM

Como se señaló anteriormente, el medio en polvo seco se fabrica típicamente a través del proceso de molienda, que es laborioso y tiene una serie de problemas. Los métodos de la presente invención proporcionan la producción de un medio en polvo seco mediante el uso de la tecnología de lecho fluidizado, la que supera estas restricciones laborales y técnicas.

A. Mezclar primero en un dispositivo externo, y después el tratamiento en lecho fluidizado

Normalmente el DPM molido se mezcla con bicarbonato de sodio (como se recibe directamente del proveedor, no se necesita triturar en molino de bolas adicional) [RPM 1640 con bicarbonato de sodio a 2 g/L equivalentes]. Esta mezcla se mezcla por 20 minutos. El polvo después se coloca dentro de la cámara de lecho fluidizado y se fluidiza como anteriormente para los medios que contienen bicarbonato o medios que contienen bicarbonato con control automático de pH

B. Mezclar directamente en la cámara de lecho fluidizado, después la aglomeración

El bicarbonato de sodio se coloca en la cámara directamente con el DPM molido y se mezcla (mezclado) por un breve período de tiempo, para seguirse con la aglomeración. Esto elimina el mezclado en una unidad separada.

C. Eliminación total del proceso de trituración en molino de bolas

Todas las sustancias químicas del DPM se adicionan directamente a la cámara de lecho fluidizado y se mezclan preliminarmente seguido de la aglomeración o, más probablemente, a algunas de las sustancias químicas más gruesas, "pegajosas", etc. se les da un tratamiento breve de trituración en un triturador giratorio y después se colocan dentro del lecho fluidizado para el mezclado y la aglomeración final.

Ejemplo 6: Un método para tener todas las características anteriores dentro de este mismo DPM

Se combinó la adición del bicarbonato de sodio "fuera del estante" con el DPM molido y con control automático de pH. Se combinó además suero con DPM. Para combinar suero con DPM que contiene bicarbonato de sodio con control automático de pH, un protocolo es:

1. Adicionar bicarbonato de sodio (polvo, del proveedor) a DPM (molido o triturado).
2. Mezclar los ingredientes (mezcla, en la unidad externa o en el lecho fluidizado).
3. En un recipiente separado, reconstituir 1 L del DPM (que contiene bicarbonato) con agua (1X) y determinar la cantidad de HCL 1N, o de NaOH 1N que se requiere para ajustar el pH de la solución a 7.5. En base a un litro, al conocer la masa del polvo a aglomerarse (y por lo tanto los equivalentes de L), calcular la cantidad de HCL 1N o de NaOH 1N para el polvo total a aglomerarse en la cantidad calculada anteriormente. Adicionar esta cantidad a través del dispositivo de lecho fluidizado (tobera de inyección). (Aunque el DPM no es "líquido", es importante tener un polvo tan cerca de la neutralidad como sea posible pero no un pH tan ácido que el bicarbonato pueda liberarse cuando se adicione el suero, dado que la humedad se involucra en el proceso. A pH 7.6 o superior, una solución concentrada de bicarbonato de sodio no desarrollará gas de CO₂, pero a pH inferior el gas se liberará.)
4. Adición de suero (aglomeración extendida), basado en el porcentaje de suplementación y g a aglomerarse
5. Mediante el uso del mismo 1L de líquido 1X de (3) anterior, determinar la cantidad de HCL 1N o NaOH necesaria para ajustar el pH a pH deseado (por ejemplo, 7.2). Mediante el uso de esta información, calcular la cantidad a usarse para el peso del polvo que se aglomeró con suero (al conocer las especificaciones g/L). Adicionar esta cantidad a través del dispositivo de fluido (tobera de inyección).
6. La irradiación gamma se usa para esterilizar los medios en polvo.

En un método similar, un DPM que contiene suero puede producirse al combinar una cantidad particular de DPM con una cantidad particular de suero en polvo (preparado, *por ejemplo*, mediante secado por atomización como se describe en el Ejemplo 8 más abajo) y después aglomerar la mezcla. Por ejemplo, para la preparación de medio que contiene FBS en polvo al 10%, 55. Pueden adicionarse 5 g de FBS en polvo a 500 g de medio de cultivo en polvo y los polvos

mezclarse bien mediante agitación. Esta mezcla después puede aglomerarse con agua como se describió anteriormente, y producirá, tras la reconstitución, un medio de cultivo que contiene FBS al 10% al que puede ajustársele el pH automáticamente.

5 **Ejemplo 7: Producción de polvo de suero al 100% mediante el procesamiento en lecho fluidizado (Para simular el secado por atomización)**

METODOLOGÍA

- 10 1) Se usó el aparato de lecho fluidizado de mesa de laboratorio (Strea-1). Para la producción de suero en polvo, no se coloca nada dentro de la cámara. Se usa la palanca para sellar la unidad.
- 2) El suero se añadió por vía del dispositivo de inyección (unidad atomizadora). A medida que el suero se adicionó en la cámara, el flujo de aire se aumentó lo suficiente y el flujo de suero se disminuyó lo suficiente que ocurrió la evaporación del agua y el suero se secó suficientemente de manera que se formó el polvo instantáneamente dentro de la cámara.
- 15 3) La velocidad de la bomba se ajustó para permitir ~1ml/minuto en la cámara.
- 4) La velocidad de flujo de aire se ajustó a una posición de ~8-9.
- 5) Para limpiar los filtros de forma intermitente, la velocidad del ventilador se redujo a ~2-3. Esto se realizó de forma rutinaria cada 5-10 minutos. (La posición 8-9 del flujo de aire es tan alta que los filtros no expulsarán el polvo y se limpiarán ellos mismos).
- 20 6) Después de una ronda de vaciado del filtro, se aumentó la velocidad del ventilador a niveles previos y se encendió la bomba. (Una vez que se ajustaron estos parámetros, la bomba corrió de forma continua excepto cuando los filtros se limpiaron como se indica).
- 7) Luego que todo el líquido de suero se adicionó en el aglomerador, el secado final se realizó durante cinco minutos.
- 25 8) Los filtros se vaciaron después para recolectar tanto polvo como fuera posible, y la máquina se desconectó y el producto se removió. El suero en polvo se colocó en un envase hermético y se protegió de la luz.

Ajustes típicos del instrumento

- 30 Temperatura de secado: 60-65°C
Temperatura de aire de salida: ~33°C
Presión de vaciado: 5 bar
Presión de atomización: 2.0-2.5 bar
Intervalo de retroceso: 2, entre atomizaciones
- 35 Capacidad del ventilador: 8-9 durante la corrida
Magnahelics: Resistencia del filtro-150-250, Resistencia de placa control perforada- ~50, Volumen de aire- menor que 50.

- 40 Para determinar si la aglomeración del FBS afectó la distribución o la estructura proteica, las muestras de FBS aglomerado y el FBS líquido se corrieron en SDS-PAGE, se tiñeron para proteína y se escanearon de forma densitométrica. Como se muestra en la Figura 1, el FBS aglomerado preparado de acuerdo con los presentes métodos (Figura 1A) demostró un perfil proteico casi idéntico al observado con FBS líquido (Figura 1B). Estos resultados indican que la producción controlada de FBS en polvo seco mediante los presentes métodos no afecta sustancialmente la estructura o distribución de los componentes principales del suero.

- 45 Para determinar si la aglomeración del FBS afectó su capacidad para soportar el crecimiento y el pase celular, las células SP2/0 se colocaron en placas en DMEM que contiene FBS ("seco") aglomerado al 2% o FBS líquido al 2% y se examinaron las tasas de crecimiento y la recuperación del pase. Como se muestra en la Figura 2A, las células en placas en medios que contienen FBS aglomerado demostraron cinéticas de crecimiento similares a las células en placas en medios que contienen FBS líquido. De forma similar, las células en los medios que contienen FBS aglomerado se recuperaron del pase con tasas de crecimiento prácticamente idénticas a las células en medio que contienen FBS líquido (Figura 2B). Juntos, estos resultados indican que el FBS aglomerado de la presente invención se desempeña aproximadamente de forma equivalente al FBS líquido para soportar el crecimiento y el pase de células cultivadas.

55 **Ejemplo 8 comparativo: Producción de polvo de suero al 100% mediante secado por atomización**

- Como una alternativa para el procesamiento en lecho fluidizado, se examinó la posibilidad de producir suero en polvo mediante la tecnología de secado por atomización. Se usó un equipo secador por atomización de laboratorio de tres pies de diámetro (Mobile Minor Spray Drier; NIRO, Columbia, Maryland) para preparar el suero en polvo. El FBS líquido se aspiró en el equipo secador por atomización y se atomizó a través de una tobera Schlick 940 localizada en el medio del dispensador de aire, y el aire seco se introdujo en el atomizador a través del dispensador superior de aire del aparato. El secado por atomización se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Temperatura del aire de entrada =

200°C; temperatura del aire de salida = 70°C, presión del aire de atomización para la tobera = 2.0 bar; flujo de aire = 80.0 kg/hora; velocidad de atomización = 65 g/minuto. Durante el desarrollo de estos métodos, se usó una temperatura de aire de salida inicial de 60°C, sin embargo, se encontró que esta temperatura era demasiado baja, y la velocidad de atomización volvió a ajustarse a un nivel para alcanzar una temperatura de salida de aproximadamente 70°C la que se encontró que era la óptima. Después del secado por atomización, el suero en polvo se recolectó en el ciclón del aparato, y el aire del proceso se filtró a través de un filtro de escape previo a la recirculación dentro del aparato.

Después de la producción, el suero en polvo se caracterizó con respecto a sus propiedades físicas, en comparación con el FBS líquido del mismo lote fuente. Las muestras tomadas de fases diferentes del lote de producción (muestras "A" y "B") se reconstituyeron a una concentración de 60 44 g/L en agua destilada libre de endotoxinas (Life Technologies, Inc.), y se examinaron para niveles de endotoxina mediante el uso de una prueba de lisado Limulus Amoebocyte (Life Technologies, Inc.), para los niveles de hemoglobina (mediante la medición de forma espectrofotométrica de la absorbancia a 525 nm), y mediante espectrofotometría ultravioleta visible. Los resultados se muestran en la Tabla 1, y en las Figuras 3A y 3B.

Tabla 1. Caracterización física del suero en polvo.

Material probado	Nivel de endotoxina (EU/ml)	Hemoglobina (mg/100 ml)
FBS en polvo, Muestra "A"	0.6	7.7
FBS en polvo, Muestra "B"	< 0.3	7.7
FBS líquido (control)	< 0.3	7.2

Como se observa en la Tabla 1, el FBS en polvo demostró niveles de endotoxina y hemoglobina similares a aquellos del FBS líquido que sirvieron como el material fuente para la producción del FBS en polvo. Por otra parte, las muestras tomadas de diferentes fases del proceso de producción demostraron niveles casi idénticos de endotoxina y hemoglobina, que indican que los presentes métodos resultan en la producción de material con consistencia física aproximadamente uniforme en todo el lote de producción. Cuando las muestras de FBS en polvo y líquido se examinaron mediante espectrofotometría ultravioleta visible (Figura 3), la traza observada para FBS en polvo (Figura 3A) fue indistinguible de esa obtenida para el FBS líquido fuente (Figura 3B). Juntos, estos resultados indican que el polvo de suero preparado mediante los presentes métodos de secado por atomización tienen características casi idénticas a los del suero líquido a partir del que se preparan los polvos. Estos resultados tomados junto con aquellos del Ejemplo 7 anterior (ver, por ejemplo, Figura 1), demuestran que los métodos proporcionados por la presente invención y los métodos de secado por atomización comparativos resultan en la producción de suero en polvo con características físicas que no se alteran de aquellas del suero líquido fuente.

Ejemplo 9: Producción de medio de cultivo en polvo con pH ajustado automáticamente

Una razón para que el bicarbonato de sodio nunca se incluya en los medios en polvo es que cualquier humedad, incluso la del aire, puede resultar en una condición ácida dentro de la bolsa que resultará en la liberación de gas de CO₂. Las bolsas se hincharán y producirán lo que se denomina como "almohadas." Con el procesamiento en lecho fluidizado, la humedad dentro del aparato se reduce prácticamente a niveles despreciables previo al final del proceso. Se prepararon medios RPMI-1640 en polvo que contienen bicarbonato de sodio y no se observó evidencia de la formación de la "almohada".

Con el objetivo de preparar un medio en polvo con pH ajustado, es necesario adicionar la sustancia química de ajuste de pH (usualmente HCl o NaOH) al polvo para llevar el pH a aproximadamente 7.0-7.4 tras la adición de agua. Una vez se adiciona el bicarbonato de sodio al polvo, muchos medios en polvo se reconstituyen en agua en el lado básico de la neutralidad y necesitan la adición de HCl. Se esperaba que la adición de HCl a un polvo que contiene bicarbonato de sodio fuera problemática. Sin embargo, dado que el líquido adicionado (HCl 5N en este caso) nunca resulta en un estado humedecido o "líquido" dentro del aparato de lecho fluidizado, el bicarbonato de sodio no libera gas de CO₂ y mantiene completamente su capacidad amortiguadora. Esto se examinó en los presentes estudios mediante los experimentos de valoración por pH: se encontraron cantidades iguales de ácido, en dos experimentos separados (Figuras 4A y 4B) para reducir el pH de los medios aglomerados y los medios aglomerados con pH ajustado automáticamente mediante una cantidad idéntica a la de un medio estándar con bicarbonato de sodio adicionado al líquido en el momento de la reconstitución. Estos resultados indican que la aglomeración con el ajuste posterior de pH, y la aglomeración con ajuste de pH durante el proceso de aglomeración, funcionan igualmente bien para producir medios de cultivos en polvo con capacidad amortiguadora significativa.

Ejemplo 10: Efecto de la aglomeración en las tasas de disolución de los medios de cultivos

- Para examinar el efecto de la aglomeración de los medios de cultivo sobre la tasa de disolución del medio, las muestras de Opti-MEM I™ o DMEM se aglomeraron con agua o con FBS (2% solo para Opti-MEM I; 2% o 10% para DMEM). Tras la reconstitución de los medios aglomerados en agua, el tiempo de disolución del Opti-MEM I aglomerado ocurrió mucho más rápido que el de la disolución del Opti-MEM I en polvo estándar (Figura 5A); los resultados para el Opti-MEM I aglomerado con agua y FBS fueron idénticos. Curiosamente, sin embargo, mientras que el DMEM aglomerado con agua se disolvió en agua de forma más rápida que el DMEM en polvo estándar, el DMEM aglomerado con FBS no lo hizo (Figura 5B)
- Debido a la estructura abierta de los medios en polvo aglomerados (a diferencia de los medios en polvo tradicionales), la acción de la capilaridad hace que el agua esté en estrecha proximidad con todas las partículas en polvo. Esto previene la apariencia de "bolas de polvo, una complicación observada tras la reconstitución de la mayoría de los medios en polvo estándares que conduce a tiempos de disolución más largos". Además de la disolución más rápida, los medios aglomerados demostraron también una reducción de la arenilla. Estos resultados indican que los medios de cultivo aglomerados con agua, y algunos medios de cultivo aglomerados con FBS, son mucho más rápidos de disolver y generan menos arenilla que los medios de cultivo en polvo tradicionales.

Ejemplo 11: Crecimiento y subcultivo celular en medios de cultivo aglomerados reconstituidos

- Muchos usos de los medios de cultivo requieren adiciones de proteínas de gran peso molecular tales como suero o albúmina. Estas moléculas pueden estar en forma de soluciones o aún en polvo en el caso de la albúmina. Sin embargo, con el objetivo de asegurar la uniformidad del medio en polvo, estas proteínas se adicionan usualmente no como un polvo sino como un líquido luego de la reconstitución de los medios en polvo a granel a un medio líquido. Esto presenta algunos inconvenientes debido a que, por ejemplo, el suero debe almacenarse en el congelador para mantener el desempeño en el tiempo. Esto adiciona gastos y molestias dado que el suero debe adicionarse asépticamente a los medios, lo que aumenta las posibilidades de contaminación. Si la filtración se realiza después de la adición del suero, se necesita otra etapa de procesamiento. Por ello sería ventajoso ser capaz de proporcionar suero como parte integral de los medios en polvo.
- Por ello, los medios de cultivo se aglomeraron con agua o con varias concentraciones de FBS. El FBS se adicionó a los medios en polvo mediante su inyección en los medios en polvo secos suspendidos en el aire a altas velocidades de evaporación, como generalmente se esbozó anteriormente. El nivel de suplementación de suero fue 2% en medio Opti-MEM I, y 2% o 10% en DMEM. Después se evaluó el éxito del crecimiento y el pase de varias líneas celulares en estos medios.
- Como se muestra en la Figura 6, las células SP2/0 demostraron velocidades de crecimiento similares cuando se cultivaron en Opti-MEM I aglomerado con agua o con FBS (Figura 6A), comparado a las células cultivadas bajo condiciones convencionales de cultivo (suero líquido adicionado a medio en polvo reconstituido con agua). Resultados similares se observaron con celulares SP2/0 cultivadas en DMEM aglomerado con agua y FBS suplementado con FBS al 2% (Figura 6B), y con células SP2/0 (Figura 7A), células AE-1 (Figura 7B) y células L5.1 (Figura 7C) cultivadas en DMEM aglomeradas con agua y FBS suplementado con FBS al 10%. Además, las células SP2/0 mostraron tasas de recuperación del pase aproximadamente similares cuando se cultivaron en Opti-MEM I aglomerado con agua y DMEM suplementado con FBS al 2% (Figuras 8A y 8B, respectivamente), como las células SP2/0, las células AE-1 y las células L5.1 cultivadas en DMEM aglomerado con agua y con FBS suplementado con FBS al 10% (Figuras 9A, 9B y 9C, respectivamente) y las células SP2/0 cultivadas en DMEM aglomerado con agua suplementado con FBS al 5% (Figura 10). Además, las células SP2/0 demostraron características de pase idénticas en medios aglomerados con agua producidos en lotes grandes y en DMEM en polvo con ajuste automático de pH que contiene bicarbonato de sodio como en el DMEM líquido estándar suplementado con FBS al 5% (Figura 10).
- Juntos, estos resultados indican que los suplementos de los medios de cultivo tal como el suero animal (por ejemplo, FBS) puede aglomerarse de forma directa en los medios de cultivo y esa suplementación de los medios de cultivo durante el proceso de aglomeración de esta forma produce un medio de cultivo que proporciona soporte óptimo de crecimiento y pase de una variedad de células cultivadas. Además, estos resultados indican que los polvos de los medios de cultivo presentes pueden producirse exitosamente en lotes grandes, que incluyen los medios de la invención de ajuste automático de pH que contienen bicarbonato de sodio.

Ejemplo comparativo 12: Cultivo celular en los medios de cultivo suplementados con polvo de suero secado por atomización

- Como un corolario para los experimentos mostrados en el Ejemplo 7, las células AE-1 y las células SP2/0 se colocaron en placas en DMEM que contiene FBS secado por atomización al 2% o al 10% preparado como se describe en el Ejemplo comparativo 8, o que contiene FBS líquido al 2% o al 10%, y se examinaron las tasas de crecimiento y la

recuperación del pase de las células. Las células se inocularon en matraces de 25 cm² por triplicado a una densidad de 1 x 10⁵ células/ml en 10 ml de medio. Se determinó la densidad de células viables en los días 3-7, y cada línea celular se probó dos veces. Los resultados se muestran en las Figuras 11-13.

- 5 Como se muestra en la Figura 11, las células AE-1 cultivadas en medios que contienen FBS en polvo demostraron cinéticas de crecimiento similares a las células cultivadas en medios que contienen FBS líquido estándar. Como se esperaba, las células demostraron crecimiento más rápido a una mayor densidad en medios de cultivo que contienen FBS al 10% que en medio que contiene FBS al 2%, y demostraron picos de crecimiento aproximadamente en el cuarto día. Se observaron Cinéticas similares para dos experimentos separados (Figuras 11A y 11B), que indican que estos resultados fueron reproducibles. Resultados análogos se obtuvieron en dos experimentos en los que las tasas de crecimiento de las células SP2/0 se midieron en medios que contenían FBS en polvo o líquido (Figuras 12A y 12B). Además, las células AE-1 cultivadas en medio que contiene FBS en polvo al 5% se recuperaron del pase con tasas de crecimiento idénticas a las células en medio que contiene FBS líquido (Figura 13).
- 10
- 15 Estos resultados indican que el FBS en polvo preparado mediante los métodos de secado por atomización se desempeñan aproximadamente de forma equivalente al FBS líquido en el soporte al crecimiento y pase de células cultivadas. Junto con aquellos de los Ejemplos 7 y 8, estos resultados indican que los métodos de la presente invención y los métodos de secado por atomización comparativos pueden usarse para producir FBS en polvo, mediante las tecnologías de lecho fluidizado o de secado por atomización, que demuestran características físicas y de desempeño casi idénticas a las del FBS líquido.
- 20

Ejemplo 13: Efecto de la irradiación en el desempeño de los medios aglomerados

- 25 Recientemente, aumentaron las preocupaciones sobre la pureza biológica de los medios y los componentes de los medios (que incluye los suplementos) usados para la bioproducción, de forma particular en la industria de la biotecnología. La irradiación gamma es un proceso de esterilización que se conoce que funciona bien con ciertos líquidos y polvos que no son típicamente susceptibles a la esterilización por calor o exposición a gas tóxico. Por ello, las muestras de los medios de cultivo aglomerados con agua o FBS se irradiaron con irradiación γ con una fuente de cobalto a 25 kGy por más de varios días, y se examinaron las velocidades de crecimiento de varios tipos celulares.
- 30

- En un conjunto de experimentos, las células SP2/0 se inocularon en varios medios a 1 x 10⁵ células/ml y se cultivaron a 37°C. A varios intervalos, las muestras se obtuvieron asépticamente y los conteos celulares se determinaron mediante el contador Coulter y la viabilidad se determinó mediante la exclusión de azul tripán. Los medios se prepararon al disolver suficientes medios en polvo para preparar una solución 1 X en 1L de agua, que se agita y se filtra a través de un filtro de 0.22 μ m. Los resultados se muestran en el gráfico en la Figura 14. Aquellas condiciones en el gráfico que establece "pwrdr FBS" en el gráfico se refiere a la adición de FBS en polvo (preparado como en el Ejemplo 7 o el Ejemplo 8 comparativo anteriores) al medio reconstituido preparado a partir de los medios en polvo estándares o a partir de los medios aglomerados (irradiados o sin irradiar). Aquellas condiciones en el gráfico que establecen "Irradia aglom. DMEM + FBS" se refieren al uso del lecho fluidizado para preparar medios aglomerados mediante la atomización de FBS en el medio en polvo (estándares o aglomerados) para preparar un medio aglomerado con FBS.
- 35
- 40

- Como se muestra en la Figura 14, la irradiación γ de medios basales en polvo estándares y los medios basales aglomerados no afectan de forma perjudicial la capacidad de estos medios para sostener el crecimiento de las células SP2/0. Además, aunque la irradiación impactó negativamente los medios en polvo que contienen FBS en polvo, y FBS en polvo en si, este efecto disminuyó con el aumento de la concentración de suero.
- 45

- Para examinar de forma más general estos efectos de las irradiaciones γ , las muestras de células VERO se inocularon en VP-SFM™ que se reconstituyó o se aglomeró de forma convencional como anteriormente. A los medios en polvo en la cámara de aglomeración, sin embargo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el quelato de citrato férrico, suplementos tradicionales para estos medios, se adicionaron a través de la tobera de atomización durante la aglomeración. Después los medios se usaron de forma directa o se irradiaron con γ como se describió anteriormente. Las células se inocularon a 3 x 10⁵ células/matraz en matraces T-25 y se incubaron a 37°C. Los conteos y la viabilidad celular se realizaron como se describió anteriormente, con los resultados mostrados en la Figura 15.
- 50

- Como se muestra en la Figura 15, las células VERO demostraron un crecimiento aproximadamente equivalente y pase exitoso cuando se cultivaron en medios aglomerados que se irradiaron con γ como en medios aglomerados que no se irradiaron con γ . Además, la irradiación del medio no tuvo efecto en los suplementos de cultivo de bajo nivel ELF y el quelato de citrato férrico que estaban presentes en el medio.
- 55

- Estos resultados indican que la irradiación γ puede usarse como una técnica de esterilización en la preparación de
- 60

medios de cultivo aglomerados a granel, que incluyen aquellos que contienen suero, EGF u otros suplementos, mediante los presentes métodos.

Ejemplo 14: Efecto de la irradiación en el desempeño del suplemento de los medios en polvo

Para demostrar la eficacia de los presentes métodos para producir suplementos de medio estériles, se irradió la holotransferrina humana liofilizada mediante la exposición a una fuente γ de cobalto a 25 kGy por aproximadamente 3 días a -70°C o a temperatura ambiente se cultivaron después células 293 en medios que se suplementaron con transferrina irradiada o con transferrina control que no se irradió (almacenada a -70°C o a temperatura ambiente), y el crecimiento celular se comparó al del medio de cultivo que contiene la transferrina estándar o al medio que no contenían transferrina.

Las células 293 en medio de la fase logarítmica que se cultivaron en medio 293 libre de suero (293 SFM) se cosecharon, se lavaron una vez a 200 x g por 5 minutos y se resuspendieron en 293 SFM libre de transferrina para el conteo y la determinación de la viabilidad. Las células se colocaron en placas en matraces Ehrlenmeyer de 125 ml por triplicado a una densidad de 3×10^5 células/ml en un volumen de 20 ml en 293 SFM (control positivo), 293 SFM libre de transferrina (control negativo), en 293 SFM que contiene transferrina sin irradiar almacenada a -70°C o a temperatura ambiente, o en 293 SFM que contiene transferrina irradiada preparada como se describió anteriormente. Los matraces se colocaron en un agitador giratorio ajustado a aproximadamente 125 rpm, en una incubadora de 37°C equilibrada con una atmósfera de 8% de CO_2 /92% de aire. El conteo celular se determinó diariamente mediante el uso de un contador de partículas Coulter y las viabilidades se determinaron mediante la exclusión con azul tripán de acuerdo con los procedimientos estándares. Cuando las células alcanzaron una densidad de aproximadamente 1.2 a 1.7×10^6 por matraz, los contenidos de uno de los matraces de cada muestra se cosecharon, se centrifugaron, se resuspendieron en el medio fresco y se pasaron a tres matraces nuevos. Los conteos y las viabilidades celulares de los pases previos y posteriores se realizaron después como se describió anteriormente. Se probaron cuatro pases consecutivos de células incubadas bajo las condiciones anteriores.

Como se muestra en las Figuras 16A-16D, las células cultivadas en medio que contiene transferrina que se irradió con γ a -70°C o a temperatura ambiente demostraron cinéticas de crecimiento y supervivencia casi idénticas en el primer pase (Figura 16A), segundo pase (Figura 16B), tercer pase (Figura 16C) y cuarto pase (Figura 16D) como las células cultivadas en 293 SFM estándar o en 293 SFM que contiene transferrina que no se irradió con γ . Las células cultivadas en medios libres de transferrina, sin embargo, sobrevivieron bien durante el primer pase (Figura 16A) pero pararon el crecimiento y demostraron una pérdida significativa en la viabilidad tras el subcultivo (Figura 16B).

Estos resultados demuestran que la irradiación γ puede usarse como una técnica de esterilización en la preparación de suplementos de medios de cultivo en polvo a granel, tales como transferrina, en los métodos de la presente invención. Además, estos datos indican que los suplementos de los medios de cultivo tales como la transferrina pueden irradiarse con γ a temperatura ambiente sin pérdida significativa de la actividad.

Ejemplo 15: Efecto de la irradiación en las características bioquímicas el suero en polvo

Para determinar adicionalmente el impacto de la irradiación γ sobre el suero, se irradiaron muestras de FBS en polvo secado por atomización a 25 kGy a -70°C o a temperatura ambiente (RT), y se analizaron comercialmente para las concentraciones de varios constituyentes bioquímicos en el suero. Como controles, se analizaron también las muestras de FBS secado por atomización y FBS líquido sin irradiar. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis químico de FBS secado por atomización

Constituyente	FBS seco, Irr. @ - 70°C	FBS seco, Irr. @RT	FBS seco sin irradiar	FBS líquido	Unidades	Intervalo de Referencia
Sodio	139	137	139	140	mM	136-144
Potasio	13.2	13.2	13.0	13.2	mM	3.6-5.2
Cloruro	98	97	98	100	mM	98-108
Ácido úrico	1.6	1.3	1.7	1.9	mg/dl	2.2-8.3
Fósforo	10.1	10.1	9.6	10.2	mg/dl	2.2-4.6
Calcio	14.9	14.8	14.8	14.5	mg/dl	8.6-10.2
Calcio ionizable	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5	mg/dl	3.8-4.5
Magnesio	2.77	2.76	2.75	2.76	meg/l	1.4-2.0
Fosfatasa alcalina	57	47	68	269	U/l	31-142
GT Gamma (GGTP)	3	5	<5	5	U/l	1-60
AST (SGOT)	7	5	5	33	U/l	1-47
ALT (SGPT)	5	<5	<5	7	U/l	1-54
LD	56	<50	50	510	U/l	110-250
Bilirrubina total	0.19	0.24	0.22	0.13	mg/dl	0.2-1.4
Bilirrubina directa	0.04	0.07	0.07	0.04	mg/dl	0.0-0.3
Glucosa	67	38	39	88	mg/dl	65-125
BUN	15	15	15	15	mg/dl	6-23
Creatinina	2.98	3.08	3.1	2.77	mg/dl	0.1-1.7
Relación BUN/Creatina	5.0	4.9	4.8	5.4	---	7.0-20.

5	Proteína total	3.6	3.6	3.5	3.7	gm/dl	6.4-8.1
	Albumina	2.7	2.7	2.8	2.8	gm/dl	3.7-5.1
	Globulina	0.9	0.9	0.7	0.9	gm/dl	2.1-3.6
10	Relación Albumina/Globulina	3.0	3.0	4.0	3.1	---	1.1-2.3
	Colesterol	30	30	32	30	mg/dl	<200
	Colesterol HDL	28	30	30	27	mg/dl	39-90
	Relación Col/HDL	1.07	1.00	1.07	1.11	---	<4.5
15	Triglicéridos	72	74	72	73	mg/dl	30-200
	Hierro	213	217	214	186	meg/dl	40-175
20	Plasma Hb	13.3	11.5	13.7	22.6	mg/dl	3.4-20.5

Estos resultados indican que el proceso de irradiación γ no afecta de forma significativa las concentraciones de la mayoría de los constituyentes bioquímicos de FBS. Estos resultados indican además que tras el secado por atomización, varios de los componentes de FBS (fosfatasa alcalina, AST, y LD, y posiblemente glucosa) sufren una reducción significativa en la concentración comparado a sus concentraciones en el FBS líquido inicial.

Ejemplo 16: Efectos de la irradiación en el desempeño del suero en polvo

Para examinar el impacto de la irradiación γ sobre la capacidad del suero de polvo seco para sostener el crecimiento celular, se usaron muestras de FBS secado por atomización irradiado bajo varias condiciones para suplementar los medios de cultivo, y las células adherentes y en suspensión se crecieron por más de tres pases en estos medios. Se usaron como modelo de células en suspensión, las líneas de hibridoma SP2/0 y AE-1, mientras los cultivos VERO y BHK se usaron como células adherentes típicas. Las células se cultivaron en medio que contienen suero de prueba o suero control (secado por atomización pero sin irradiar) por más de tres pases de acuerdo con los procedimientos generales esbozados en el Ejemplo 14 anterior. En cada punto de pase, las células se cosecharon y se subcultivaron, mientras se contó una alícuota para células viables células/ml como anteriormente. Los resultados en cada punto se expresaron como un porcentaje del conteo celular viable obtenido en medio suplementado con FBS líquido, y se muestran en las Figuras 17A, 17B, 17C y 17D.

Se pueden sacar varias conclusiones de los resultados de estos estudios. Primero, la irradiación γ no parece reducir la capacidad del FBS secado por atomización para sostener el crecimiento de células en suspensión y adherentes (comparar los conjuntos de datos irradiados al conjunto de datos sin irradiar en cada figura). De hecho, las células BHK (Figura 17D) en realidad crecen *mejor* en el medio que contiene FBS en polvo que se irradió a -70°C que en el suero sin irradiar. Segundo, el suero irradiado a -70°C parece desempeñarse mejor que aquellos irradiados a temperatura ambiente en su capacidad para sostener el crecimiento celular, excepto quizás por las células VERO (Figura 17C). Finalmente, los resultados de estos estudios fueron muy específicos del tipo celular: las células en suspensión (Figuras 17A y 17B) crecieron mejor en FBS secado por atomización, irradiadas y sin irradiar, que las células adherentes (Figuras 17C y 17D); y entre las células adherentes, las células BHK (Figura 17D) crecen mejor en FBS secado por atomización que las células VERO (Figura 17C).

Estos resultados demuestran que la irradiación γ puede usarse como una técnica de esterilización en la preparación de suero en polvo a granel, tal como el FBS, en los métodos de la presente invención. Además, a diferencia de las reportadas para la transferrina en el Ejemplo 14 anterior, estos datos sugieren que la temperatura óptima para la irradiación de suero, con el objetivo de mantener la capacidad del suero para sostener el crecimiento celular, es preferible que esté por debajo de la temperatura ambiente.

REIVINDICACIONES

1. Un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos que soportan el cultivo de una célula in vitro que comprende partículas de aproximadamente 1-100 mesh de tamaño, y que comprenden vitaminas y aminoácidos.
2. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la reivindicación 1 en donde las partículas son de aproximadamente 2-50 mesh.
3. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la reivindicación 1, en donde las partículas son de aproximadamente 50-100 mesh.
4. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente, en donde los aminoácidos son L-glutamina y cistina.
5. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente que se obtiene mediante un método que comprende la etapa de secar el medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado o combinación de estos a una temperatura de 50-80°C.
6. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente, que se obtiene mediante un método que comprende:
 - (a) colocar un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación de estos en un aparato de lecho fluidizado;
 - (b) someter dicho medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación de estos en una columna de movimiento ascendente de un gas;
 - (c) pasar dicho medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación de estos a través de un filtro, en donde el filtro es un tamiz de malla;
 - (d) inyectar una cantidad controlada y definida de un líquido en la corriente del medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación de estos para producir un estado húmedo; y
 - (e) secar el producto de la etapa (d) para producir un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado o combinación de estos.
7. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde los componentes individuales se mezclan previo al proceso de aglomeración para resultar en un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado de un solo componente.
8. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la reivindicación 6, que tiene un tamaño de partícula más grande en comparación con el medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación de estos de la etapa (a).
9. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el filtro es un tamiz de malla de aproximadamente 3.5 - 15 mesh.
10. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el filtro es un tamiz de malla de aproximadamente 4 a 6 mesh.
11. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente que es un polvo de medio de cultivo celular eucariótico.

12. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes adicionales que comprenden:
- 5 (i) una o más sales amortiguadoras; y
(ii) un ácido o base,
- 10 en donde el medio, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador o combinación de estos es adecuado para la reconstitución que se realiza en una etapa y resulta en un medio, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador con ajuste automático de pH o combinación de estos.
13. Usar el medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente para el cultivo de células en donde el medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo o combinación se reconstituye en un disolvente previo a contactar las células.
14. Un estuche que comprende el medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. El estuche de la reivindicación 14 que comprende además uno o más envases.
16. Un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos que comprenden partículas de aproximadamente 1-100 mesh que soporta el cultivo de una célula *in vitro*, que comprende vitaminas y aminoácidos, que se disuelve rápidamente para producir una solución con ajuste de pH automático tras la reconstitución, y que es opcionalmente un medio, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador de un solo componente o cualquier combinación de estos obtenidos mediante la mezcla de componentes individuales.
17. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de la reivindicación 16, que se usa para el cultivo de levaduras, células vegetales o células animales.
18. El medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde el líquido de la etapa (d) es agua, el agua que tiene incorporada en ella uno o más ingredientes seleccionados de aminoácidos y vitaminas.
19. Un método para reconstituir un medio nutritivo, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador en polvo aglomerado en lecho fluidizado o combinación de estos de cualquier reivindicación precedente, en donde el método comprende la reconstitución de un medio, suplemento del medio, subgrupo del medio o combinación de estos con un disolvente.
20. El método de la reivindicación 19, en donde el medio, suplemento del medio, subgrupo del medio o amortiguador o combinación de estos comprende:
- 45 (i) una o más sales amortiguadoras; y
(ii) un ácido o base.

50

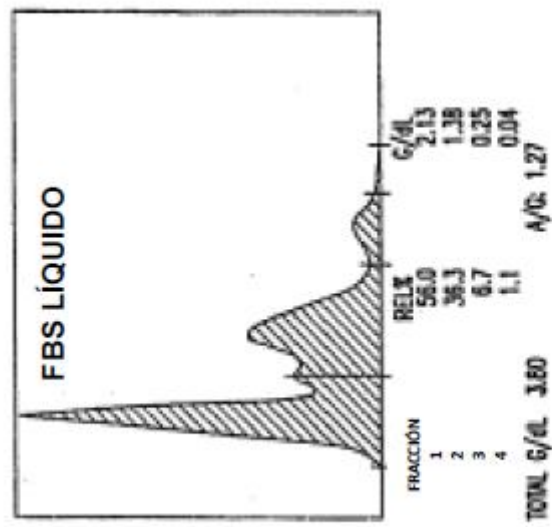


FIG.1B

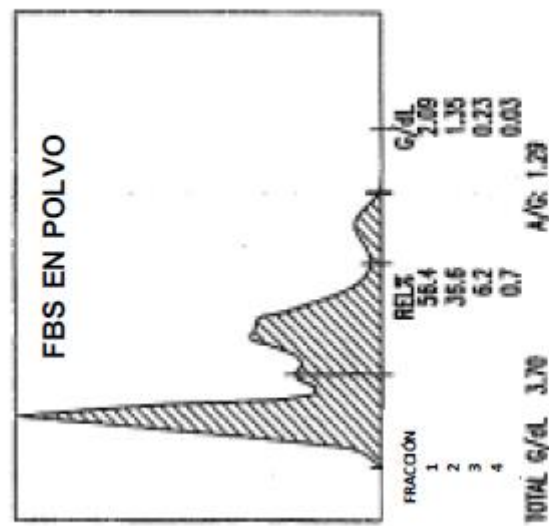


FIG.1A

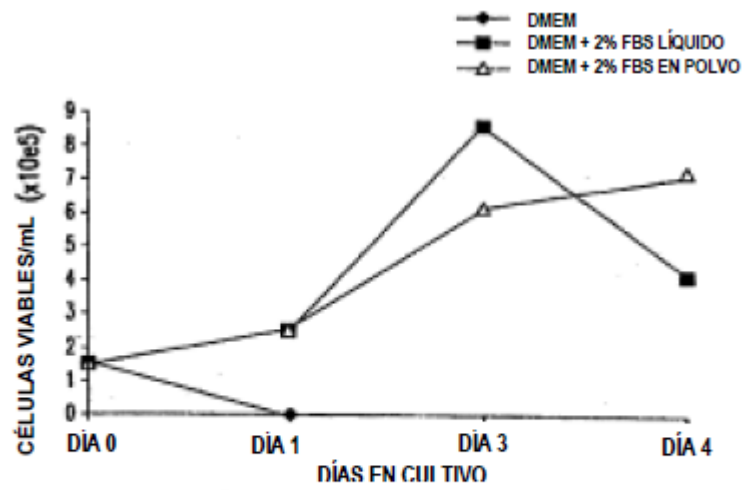


FIG.2A

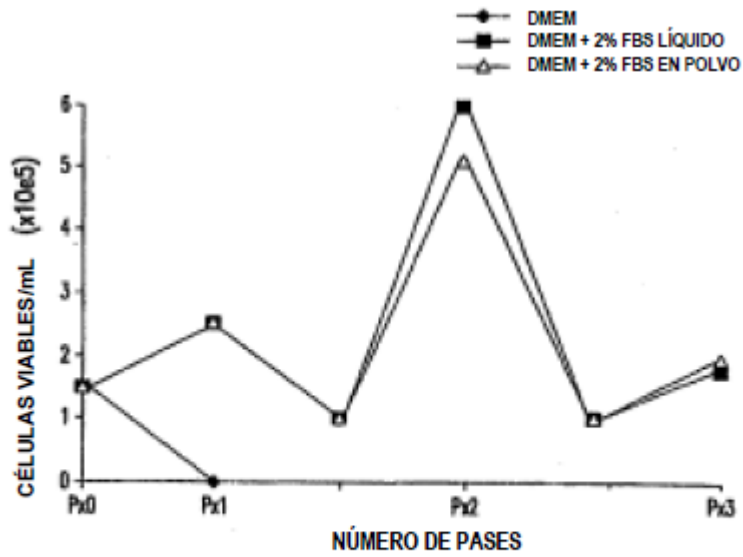


FIG.2B

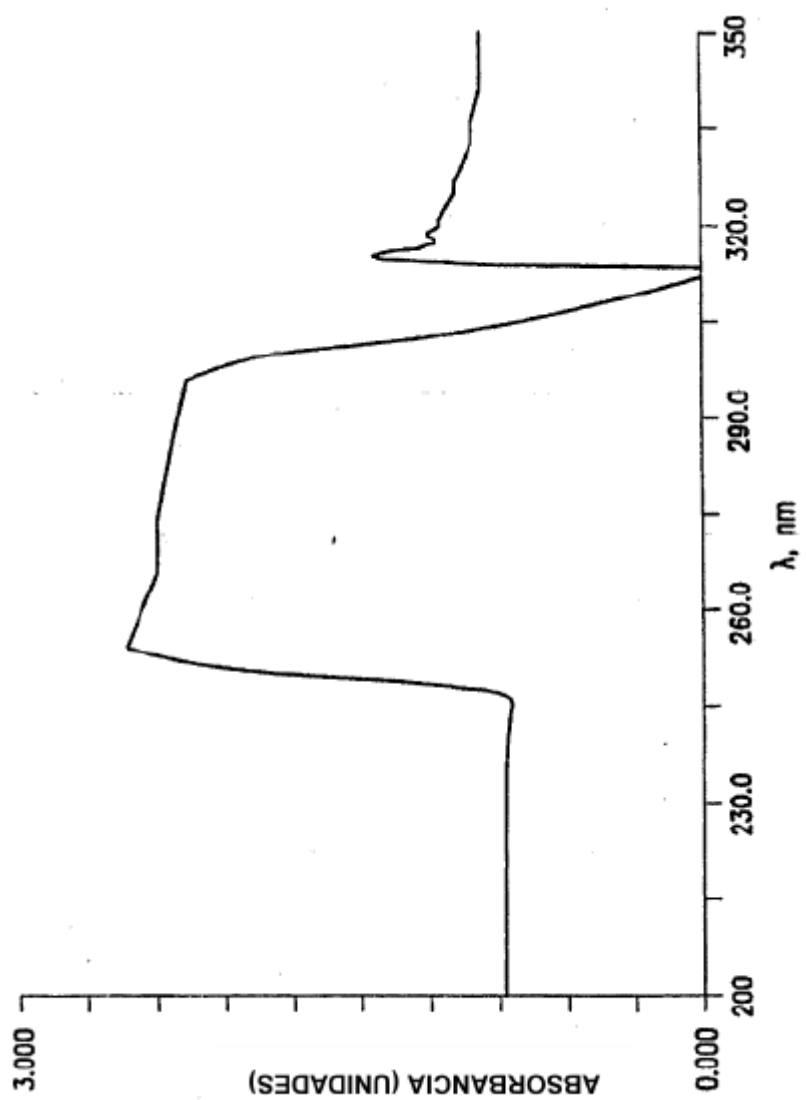


FIG.3A

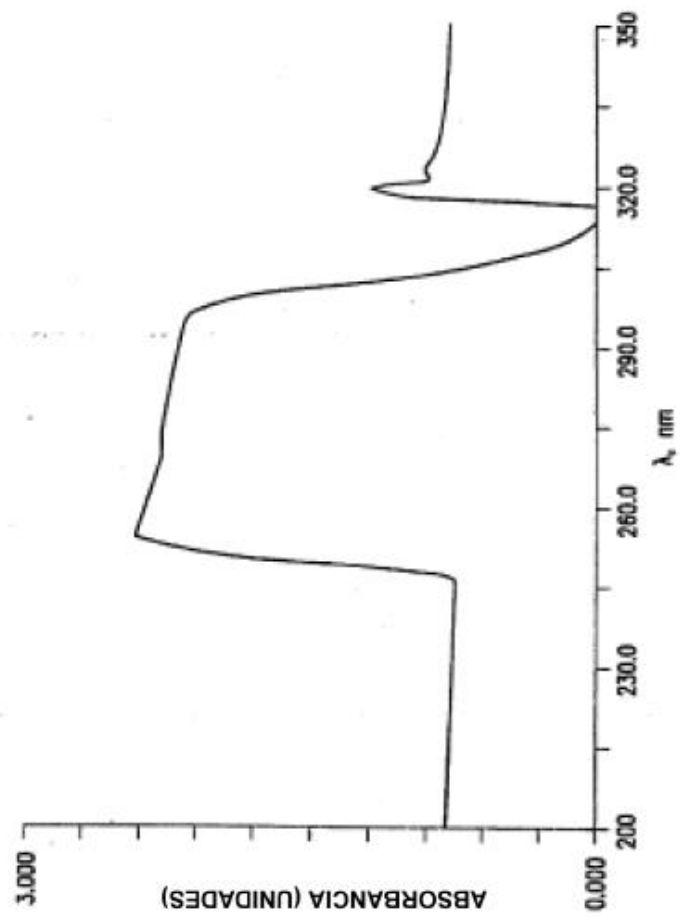


FIG.3B

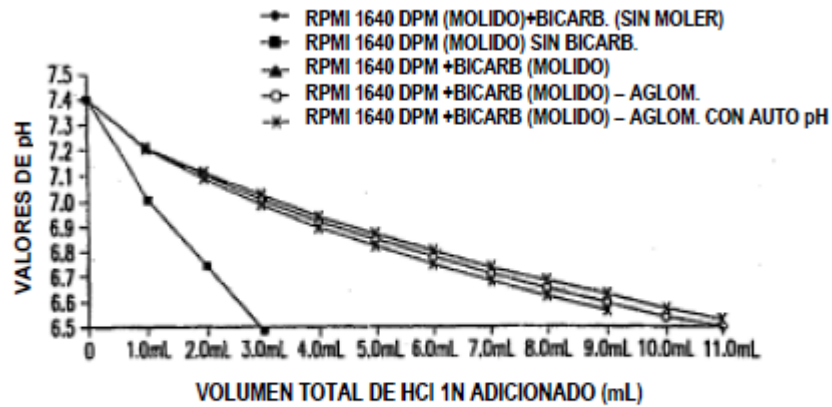


FIG.4A

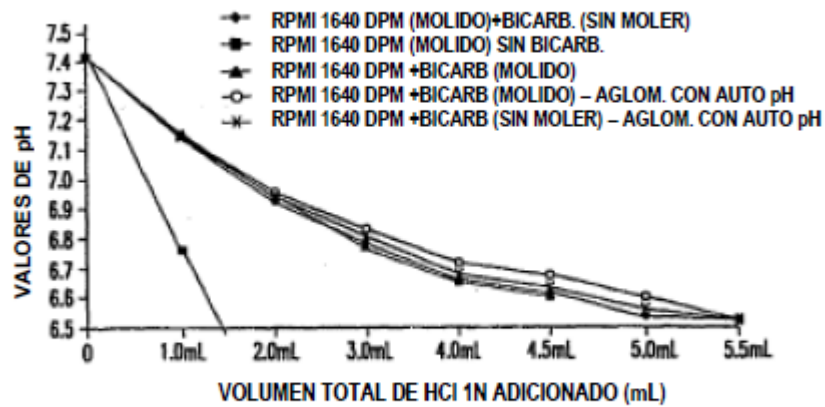


FIG.4B

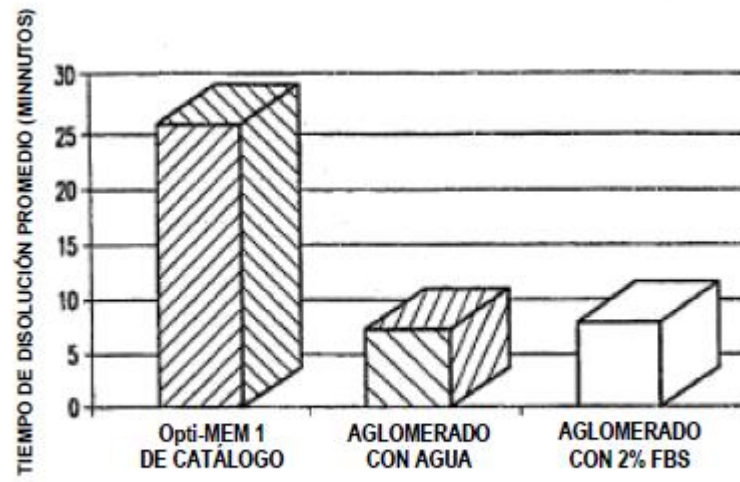


FIG.5A

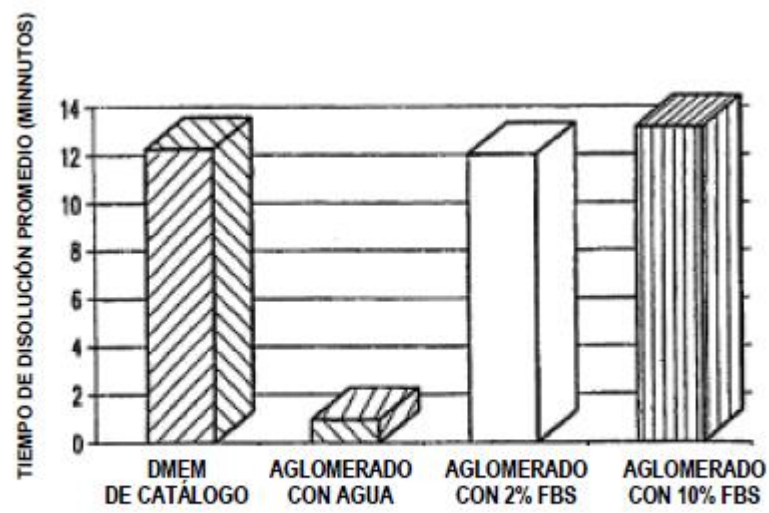


FIG.5B

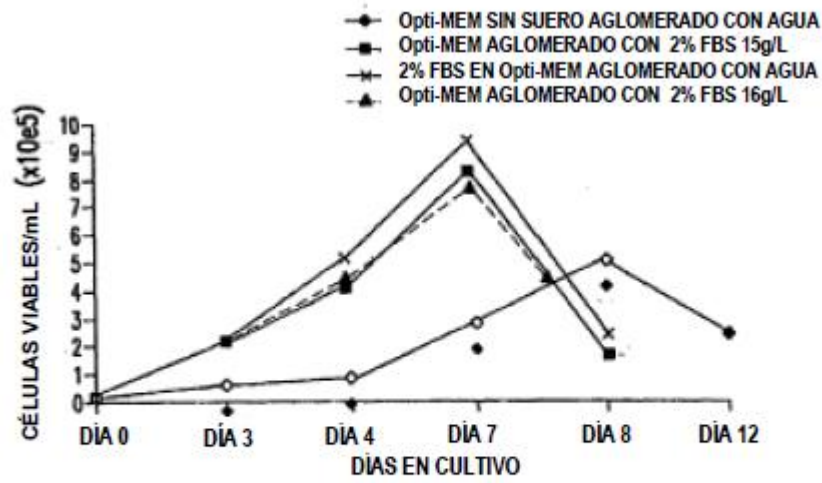


FIG.6A

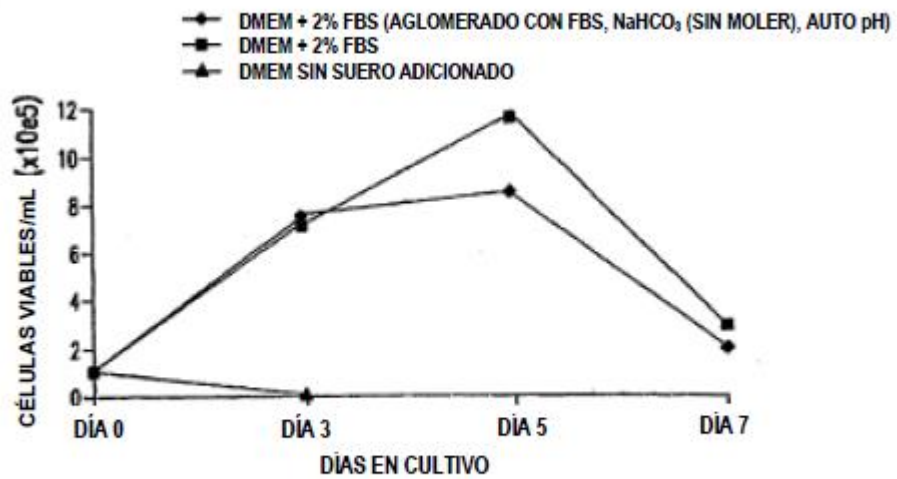


FIG.6B

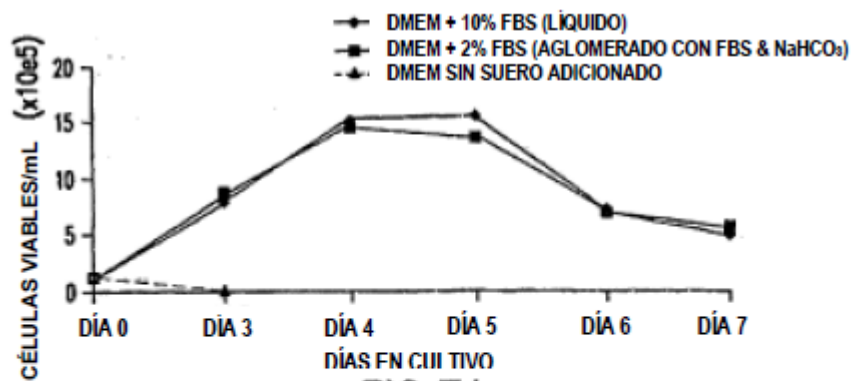


FIG.7A

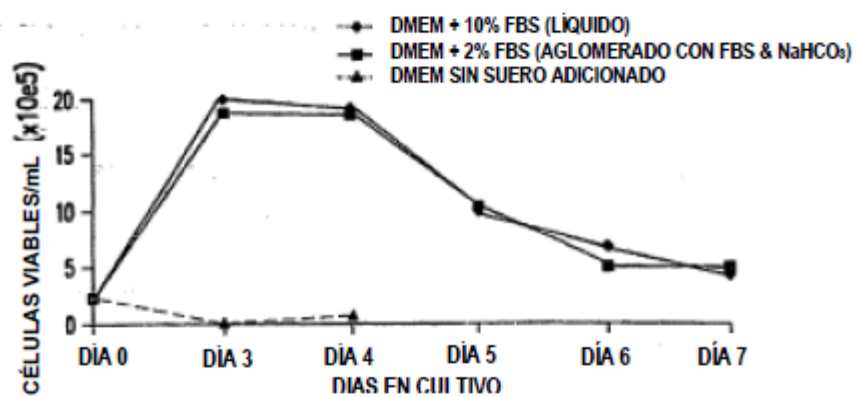


FIG.7B

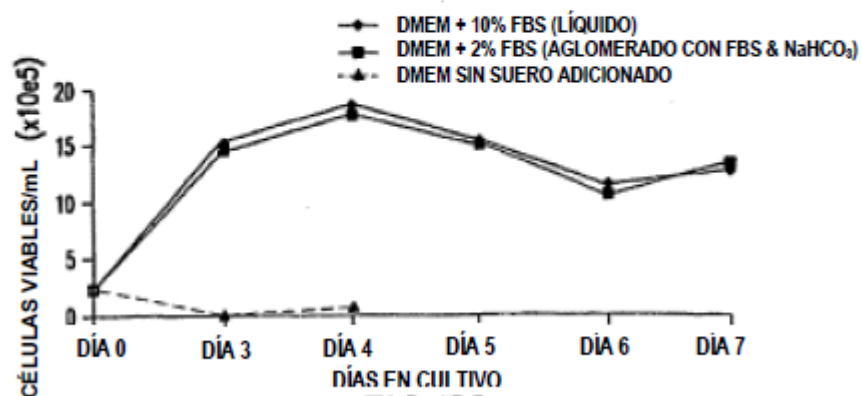
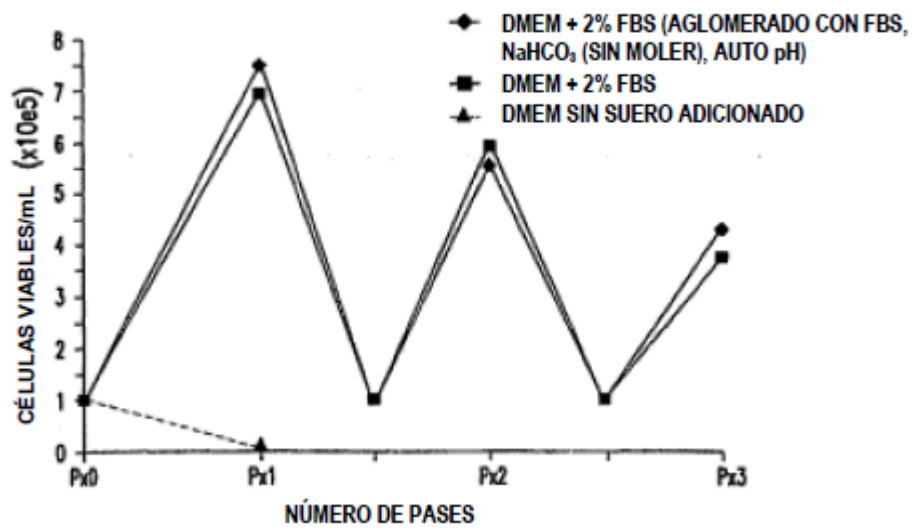
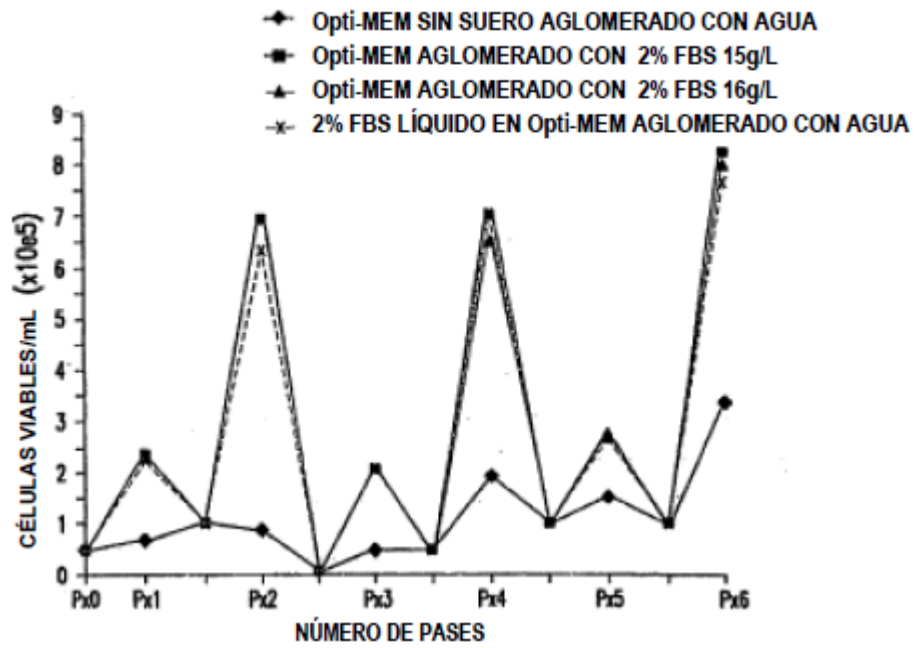


FIG.7C



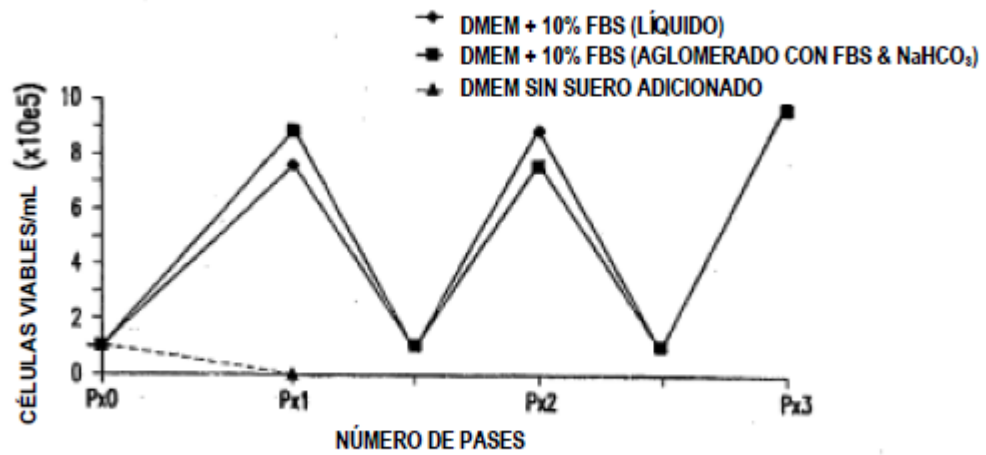


FIG.9A

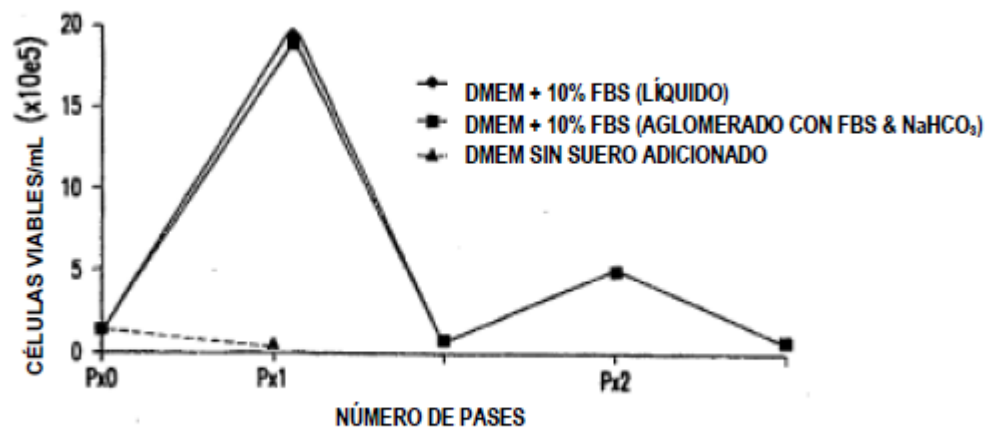


FIG.9B

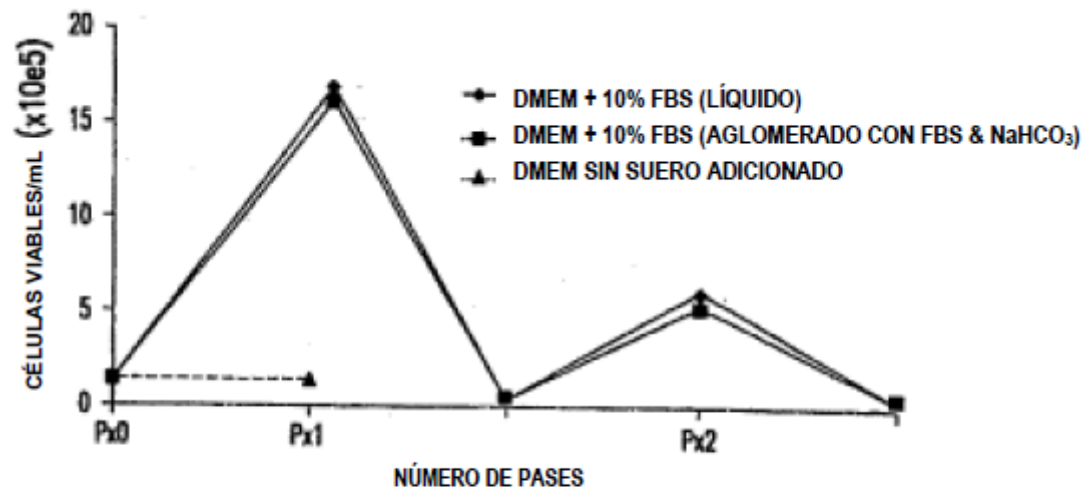


FIG.9C

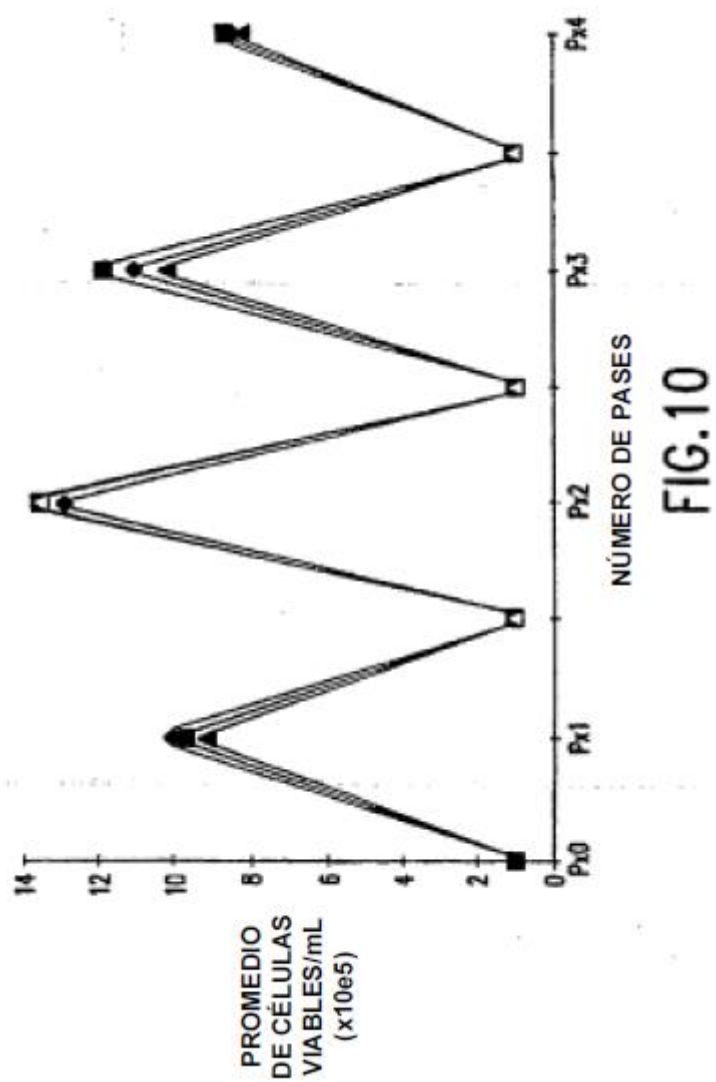
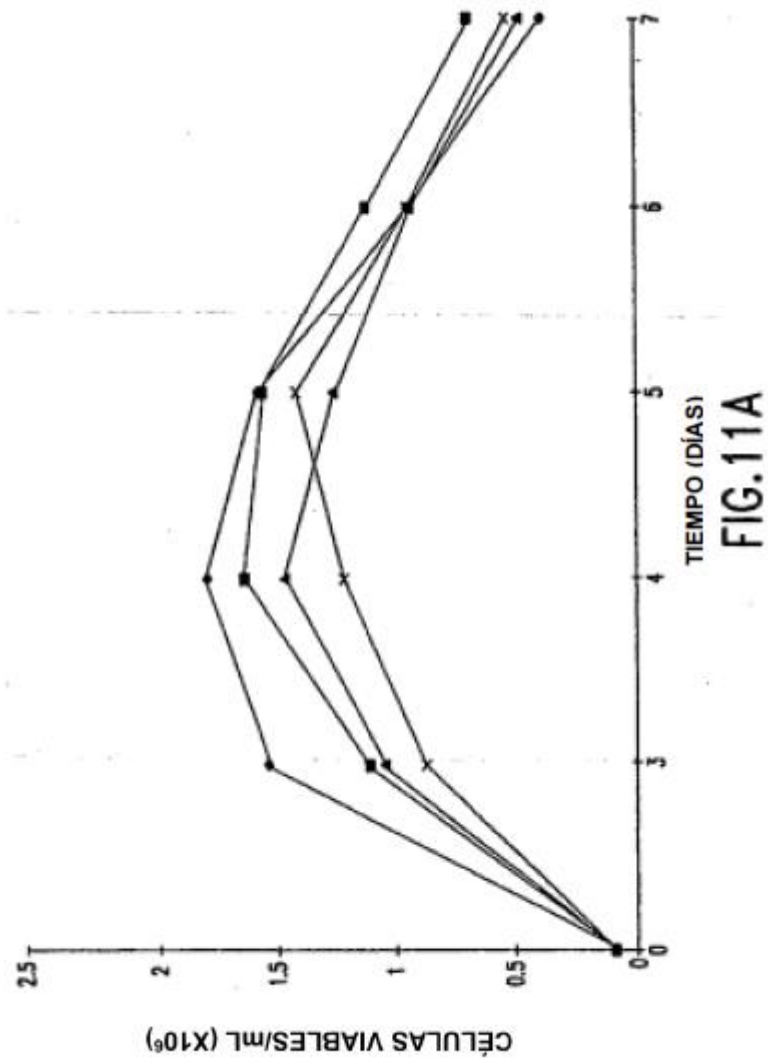
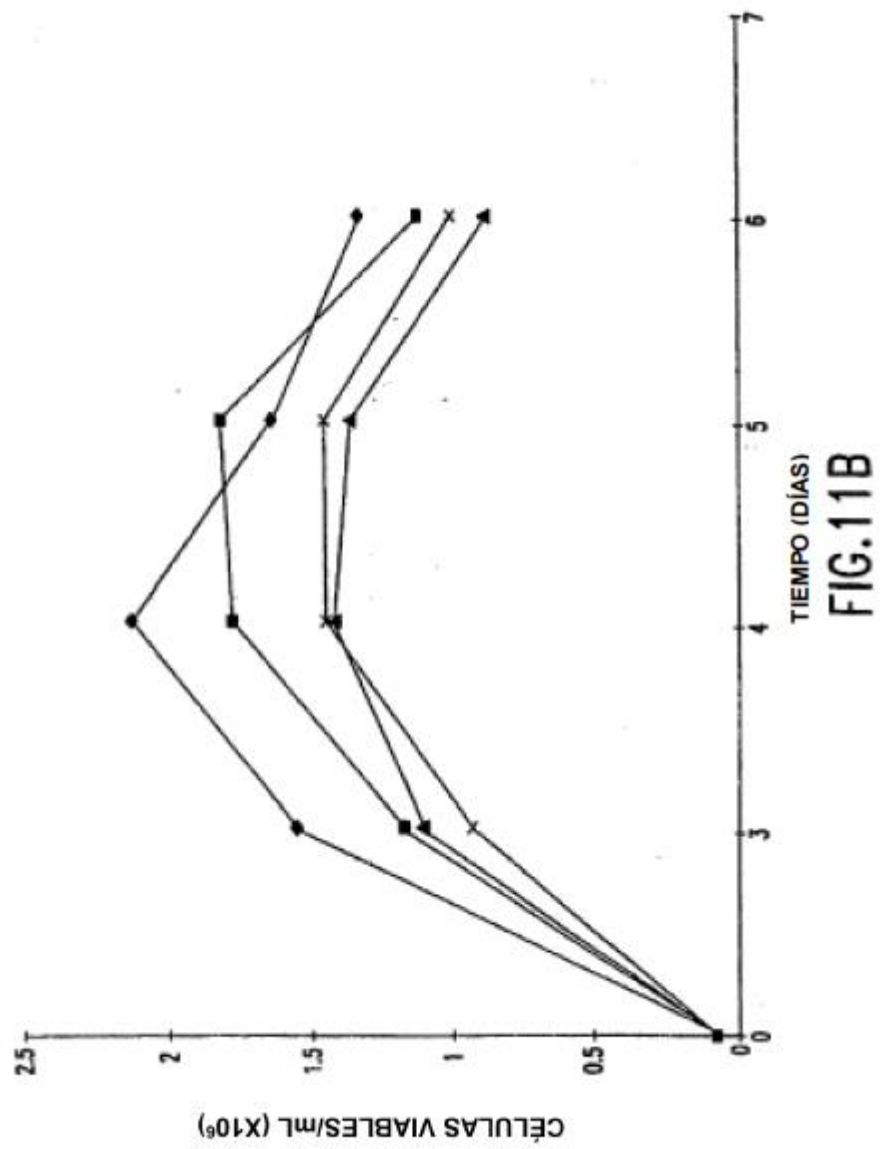
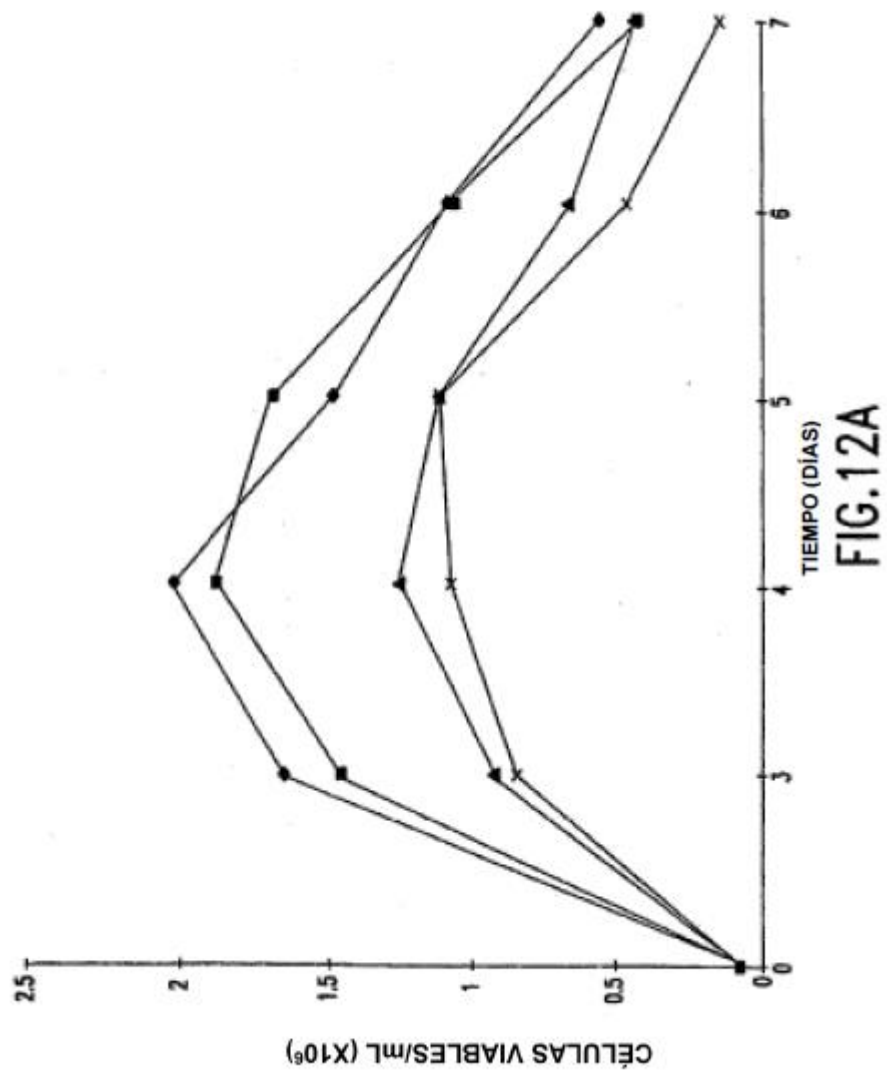
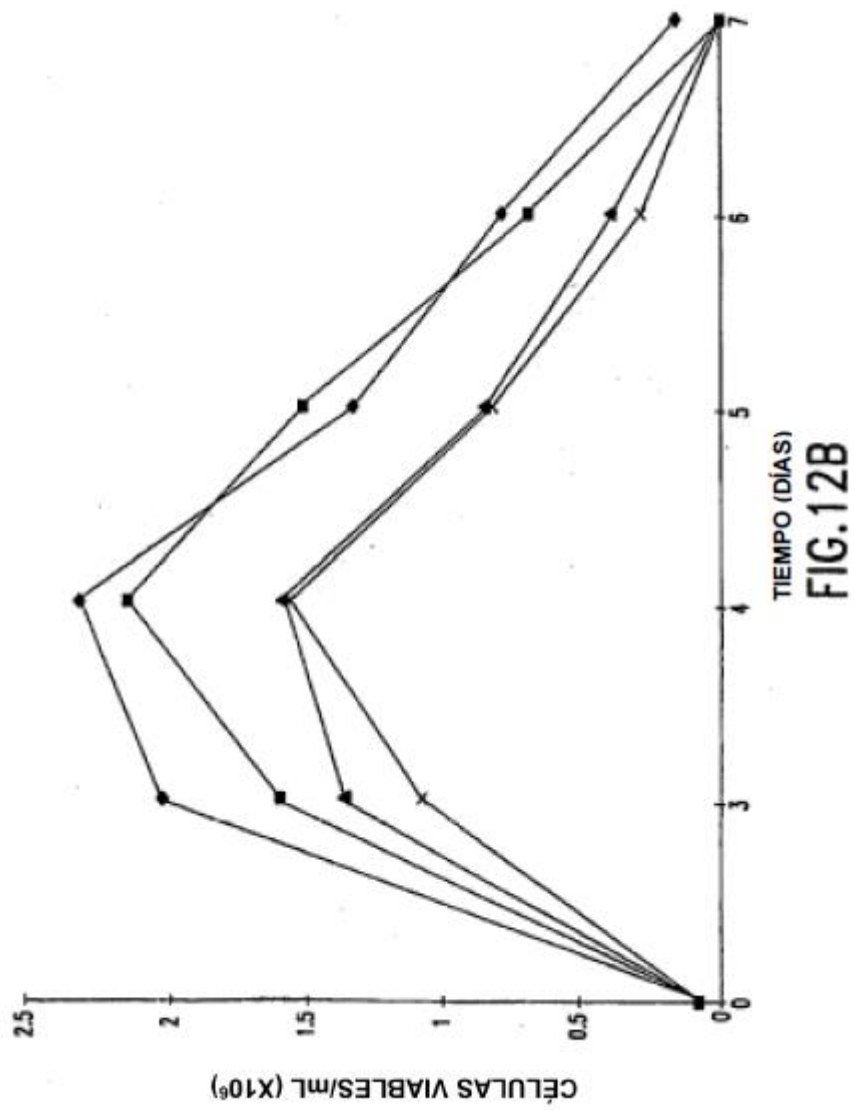


FIG.10









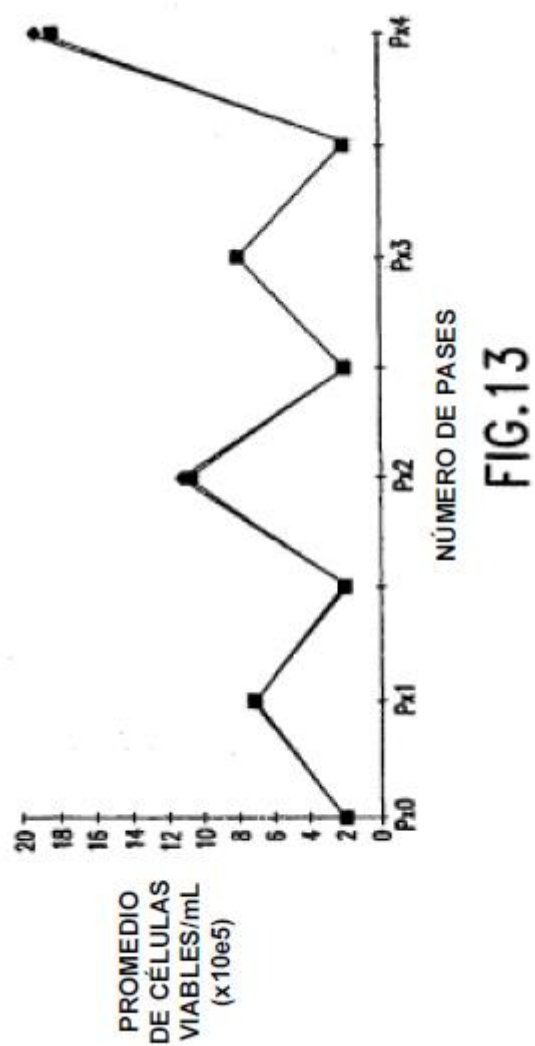


FIG.13

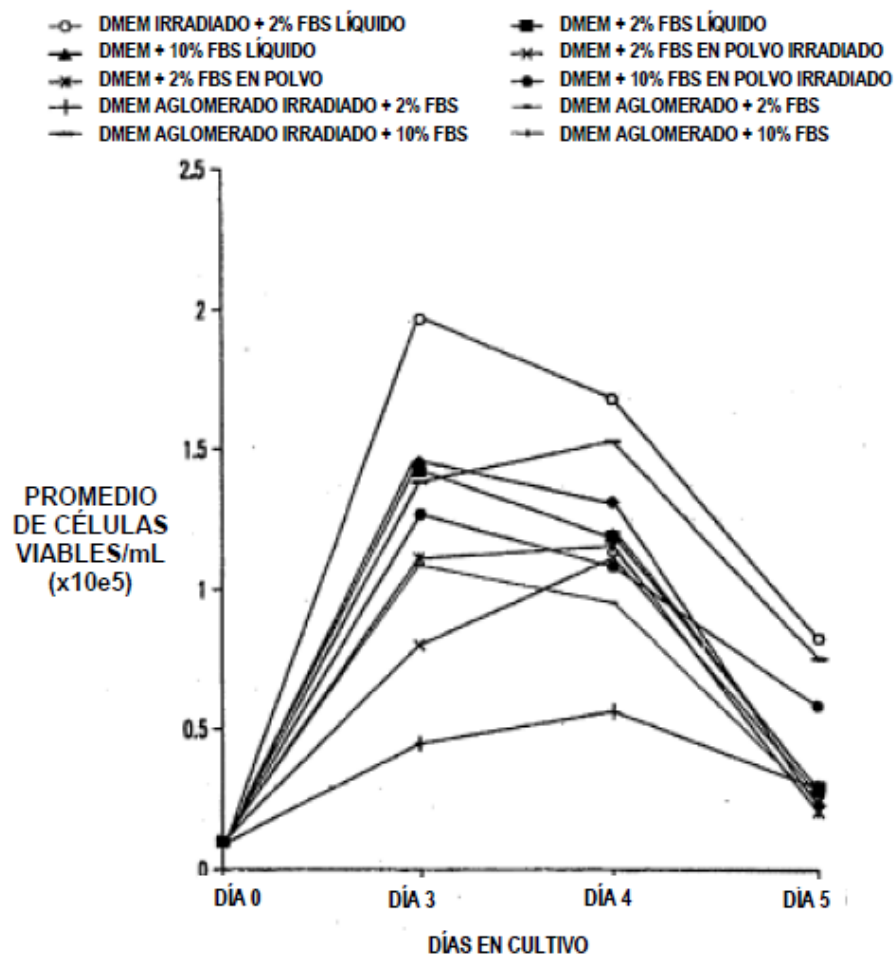


FIG.14

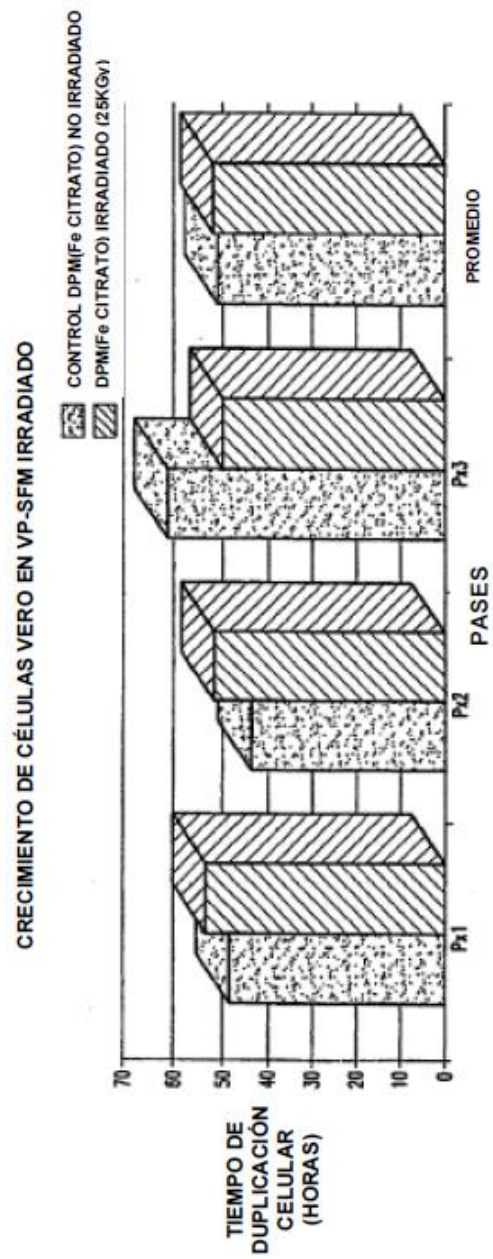


FIG.15A



FIG.16A

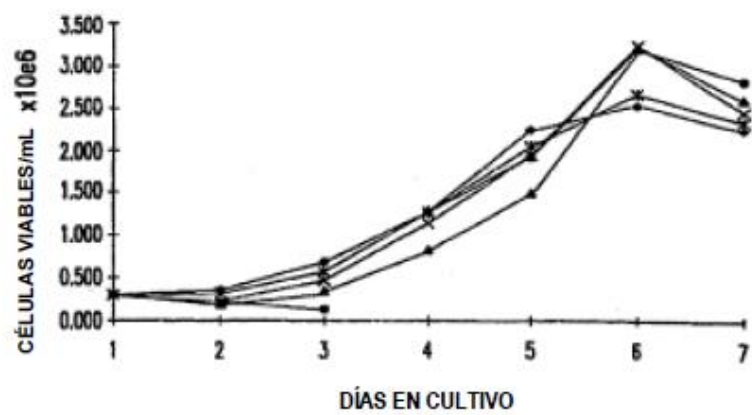


FIG.16B

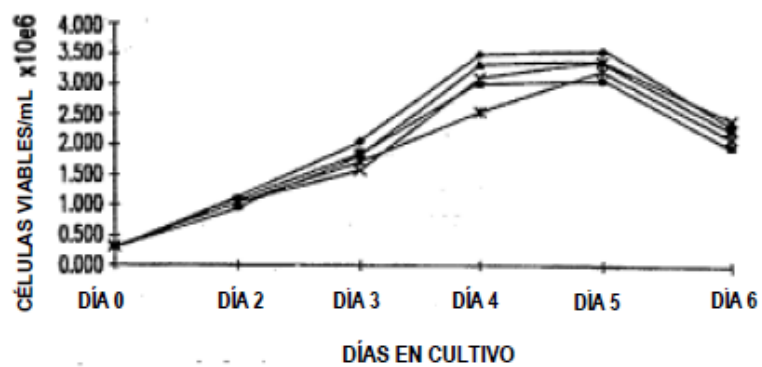


FIG.16C

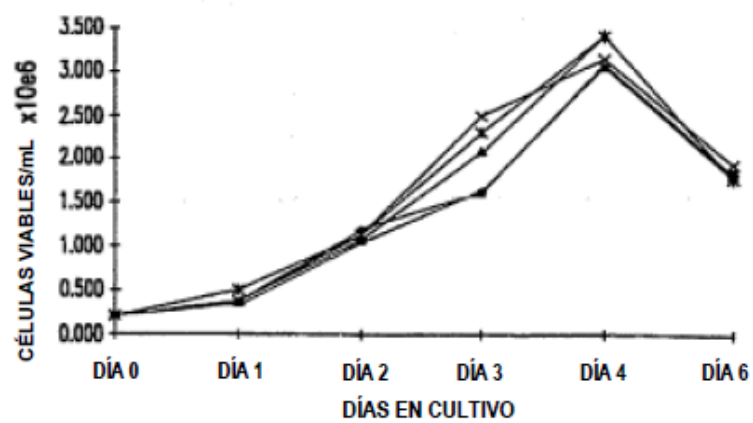
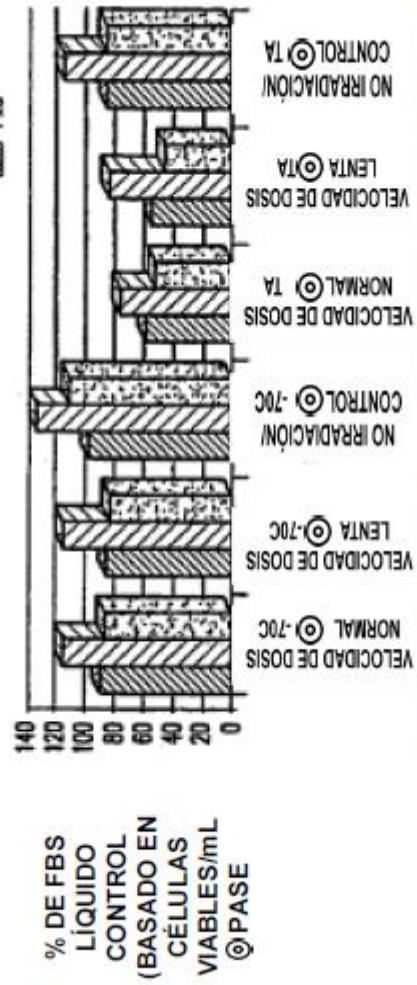


FIG.16D

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN DE FBS SECADO
POR ATOMIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS SP-2



CONDICIONES DE IRRADIACIÓN DE FBS SECADO POR ATOMIZACIÓN

FIG.17A

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN DE FBS SECADO
POR ATOMIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS AE-1

 P₁i
 P₂i
 P₃i

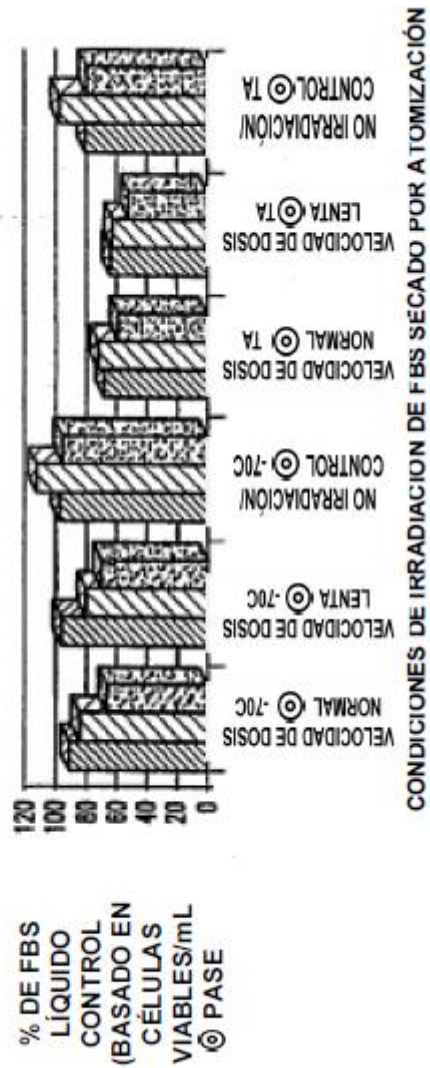


FIG.17B

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN DE FBS SECADO
POR ATOMIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS VERO

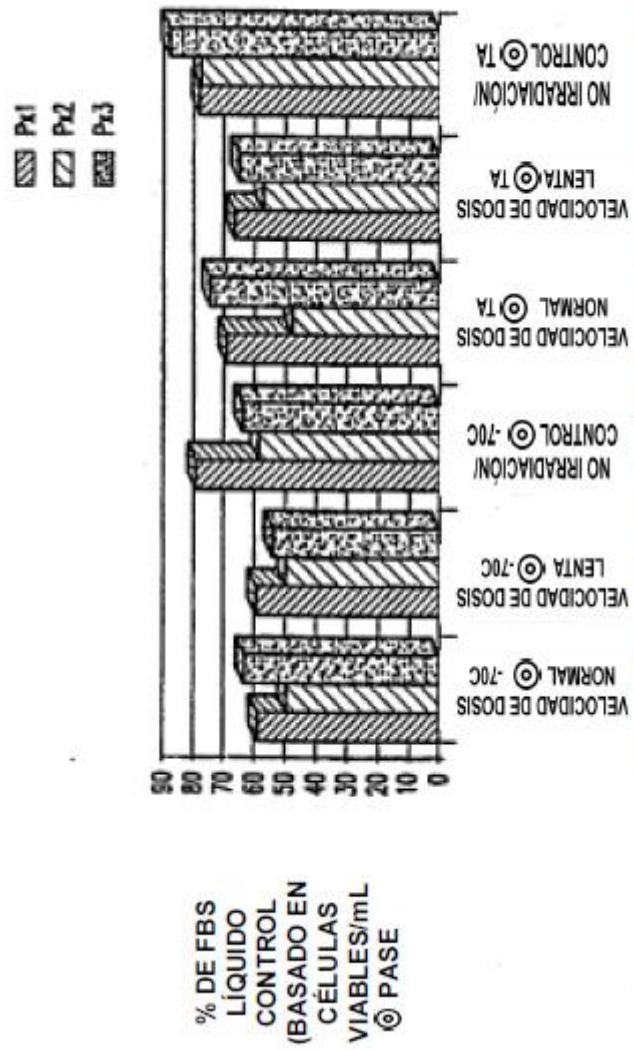


FIG.17C

CONDICIONES DE IRRADIACIÓN DE FBS SECADO POR ATOMIZACIÓN

