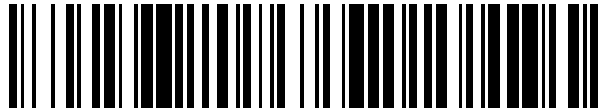


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 349**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2011 E 11788050 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2652123**

54 Título: **Medios de cultivo celular granulados secos**

30 Prioridad:

16.12.2010 US 423700 P

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

04.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RAYNER-BRANDES, MICHAEL HOWARD y
ZHAO, XIAOJIAN (DAVID)**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 349 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

Medios de cultivo celular granulados secos

5 La presente invención se refiere a medios de cultivo celular granulados secos que no comprenden peptonas ni triptonas, especialmente a formulaciones de medios de cultivo celular granulados secos que soportan el crecimiento de células de mamífero y/o de insecto y/o de planta. La presente invención se refiere además a la producción de estos medios de cultivo celular granulados secos y a su uso.

Antecedentes de la invención

Los medios de cultivo celular soportan y mantienen el crecimiento de células en un entorno artificial.

10 Dependiendo del tipo de organismo cuyo crecimiento se soportará, los medios de cultivo celular pueden comprender más de 10, a veces más de cien componentes diferentes.

Los medios de cultivo requeridos para la propagación de células de mamífero, de insecto o de planta normalmente son mucho más complejos que los medios mínimos suficientes para soportar el crecimiento de bacterias y levaduras.

15 Los estudios previos de cultivos celulares utilizaban medios que consistían en componentes indefinidos, tales como plasma, suero, extractos embrionarios, otros extractos biológicos no definidos o peptonas. Por tanto, se realizó un avance principal con el desarrollo de medios definidos químicamente. Los medios definidos químicamente a menudo comprenden, pero no se limitan exclusivamente a, aminoácidos, vitaminas, iones metálicos, antioxidantes, quelantes, factores de crecimiento, tampones, hormonas, cloruros y muchas más sustancias conocidas por los expertos en la técnica

20 Algunos medios de cultivo celular se ofrecen como líquidos acuosos estériles. La desventaja de los medios de cultivo celular líquidos es su semivida reducida y las dificultades para transporte y almacenamiento. Como consecuencia, muchos medios de cultivo celular se ofrecen en la actualidad como mezclas en polvo seco finamente molido. Se fabrican con el fin de disolverse en agua y/o disoluciones acuosas y se diseñan en el estado disuelto, a menudo con otros complementos, para suministrar células biológicas con una base nutriente sustancial para el crecimiento y/o la producción de productos biofarmacéuticos a partir de dichas células.

25 La manipulación de polvos finamente molidos tiene desventajas significativas. Por ejemplo, son muy pulverulentos para su manipulación, más aún en grandes cantidades, lo que puede conducir a problemas de salud de los trabajadores que manipulan el material especialmente si algunas de las materias primas individuales son peligrosas para la salud. Aunque los componentes individuales no sean tóxicos directamente, pueden provocarse problemas de salud en los trabajadores por los altos niveles de polvo en el aire respirable *per se* y las cantidades de polvo en el aire están reguladas estrictamente en muchos países debido a este problema. Además, el polvo de materiales orgánicos, más especialmente el polvo fino, puede dar como resultado fácilmente explosiones si las cantidades son excesivas y las medidas de precaución no son adecuadas para impedir la ignición por chispas.

35 Además, puede producirse en condiciones de transporte desventajosas, por ejemplo durante condiciones de transporte largo, que uno o más de los componentes individuales más ligeros de los medios en polvo seco migra(n) hacia la superficie o uno o más componentes más pesados migra(n) hacia la base del envasado primario. El resultado de esta concentración superior local o, en el centro físico del material a granel, el agotamiento de determinado(s) componente(s) individual(es) puede resultar negativo en muchos sentidos sobre la calidad de producto de los medios. Además, la segregación puede tener efectos más allá del agotamiento físico y la concentración de componentes individuales, por ejemplo, sobre las cantidades de producción de moléculas biofarmacéuticas diana por lote o más sutilmente sobre la configuración de oligosacáridos en los propios productos biofarmacéuticos lo que hace que la calidad de los medios sea absolutamente crítica para la correcta calidad biofarmacéutica hasta llegar al paciente.

45 Otro aspecto cuando se usan medios en polvo seco finamente molido es la dificultad para disolver el polvo fino en disoluciones acuosas para preparar el medio de cultivo celular acuoso final. Es muy difícil humedecer un polvo finalmente molido y disolverlo en un líquido acuoso. Por tanto, la manipulación de los medios en polvo y su uso son bastante complicados.

50 Debido a la limitación de los medios en polvo seco en cuanto a la estabilidad, mezclado y disolución, los medios en formato seco se producen habitualmente sin algunos complementos clave tales como carbonato, hidrolizados, factores de crecimiento y otros oligoelementos, que los usuarios finales complementarán cuando preparen el líquido a partir de los medios en polvo seco. La manipulación y complementación adicionales aumentarán la posibilidad de trabajo y errores muy costosos.

El documento US 2008/0254119 se refiere a la producción de comprimidos de complementos nutricionales o comprimidos farmacéuticos que comprenden un lubricante. Se menciona un compactador de rodillos como instrumento adecuado para la compactación intermedia.

5 Se conoce que los medios de cultivo celular bacteriano en polvo pueden granularse prensando el polvo hasta obtener gránulos pequeños. El resultado son partículas pequeñas con ventajas en seguridad, manipulación y rendimiento. Este procedimiento puede realizarse fácilmente para medios de cultivo celular bacteriano ya que comprenden peptonas o triptonas o componentes peptídicos equivalentes escasamente definidos químicamente que soportan la adherencia de los componentes de medios a través de su pegajosidad inherente.

10 Los medios de cultivo celular de mamífero y/o de insecto y/o de planta normalmente no contienen peptonas o sus equivalentes y por tanto son mucho más difíciles de manipular de esta manera.

El documento US 6.383.810 B2 de Invitrogen Corporation da a conocer un método de producción de un polvo de medio de cultivo celular eucariota aglomerado. El método comprende humedecer un medio de cultivo celular en polvo seco con un disolvente y luego volver a secar el medio humedecido para obtener un medio de cultivo celular aglomerado seco.

15 Una gran desventaja de este procedimiento es el hecho de que es necesario que todos los componentes de medio estén en contacto con agua y de que es necesario calentarlos para eliminar el agua después. Esto puede producir reacciones secundarias considerables entre los componentes del medio o destrucción o modificación de componentes sensibles con un resultado impredecible sobre la calidad del medio.

20 En consecuencia, existe una clara necesidad de encontrar una nueva forma de medios de cultivo celular de mamífero y/o de insecto y/o de planta que sea fácil de manipular y pueda producirse sin provocar destrucción y/o reacciones secundarias entre los componentes de medio.

Breve descripción de la invención

25 Se ha encontrado que también pueden producirse medios de cultivo celular de mamífero y/o de insecto y/o de planta definidos químicamente, libres de peptona, en forma granulada seca mediante la compactación del polvo mixto, finamente molido de los componentes de medio seco. La compactación se logra mediante aglomeración por prensado en prensas de rodillos. No es necesario usar aditivos para ayudar al procedimiento. Los medios de cultivo celular granulados secos según la presente invención tienen una semivida larga, son fáciles de manipular y se producen en condiciones muy suaves de modo que no se producen reacciones secundarias debido a humectación o calentamiento de los componentes de medio durante el procedimiento de fabricación.

30 La presente invención se refiere al uso de un medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas para cultivar células según la presente invención mediante:

a) disolver el medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas en un disolvente para formar un medio de cultivo celular líquido

b) poner en contacto dicho medio de cultivo celular líquido con dichas células que van a cultivarse

35 por lo cual dicho medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas puede prepararse mediante

a) proporcionar un medio de cultivo celular en forma de un polvo mixto de los componentes de medio, por lo cual el polvo mixto no comprende peptonas ni triptonas

b) compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos

40 y por lo cual el medio de cultivo celular que se proporciona en la etapa a) comprende uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico y la etapa b) se realiza mediante

b1) compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos

45 b2) volver a introducir todas las partes del medio de cultivo celular compactado obtenido en la etapa b1) que tienen un tamaño de partícula menor de 0,2 mm en el medio de cultivo celular en forma de un polvo mixto de los componentes de medio que va a llenarse en la prensa de rodillos.

En una realización preferida, el medio de cultivo celular que se proporciona en la etapa a) es un medio de cultivo celular de mamífero.

En una realización preferida, la capacidad de prensa de la prensa de rodillos es de entre 30 y 80 kN/cm de anchura de rodillo.

- 5 En una realización preferida, más del 80% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.

En una realización muy preferida, más del 90% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.

- 10 El medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas comprende uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

En una realización preferida, el disolvente en la etapa a) es agua.

- 15 Además de las realizaciones y aspectos individuales mencionados anteriormente de la presente invención, la presente invención también puede realizarse y ponerse en práctica en cada combinación de dos o más de las realizaciones o aspectos dados a conocer.

Descripción de la invención

La figura 1 muestra una vista esquemática de un equipo de compactación en seco adecuado para la presente invención.

- 20 La granulación en seco según la presente invención crea gránulos o partículas mediante compactación de los polvos bajo presión (sin la adición de agua u otros disolventes). Normalmente, la prensa de rodillos que se usa según la presente invención genera también copos o productos compactos más grandes. Estos productos compactos así formados normalmente se dividen suavemente, por ejemplo mediante un tamiz vibrante, para producir partículas granuladas (aglomerados). Según la presente invención, un polvo o un polvo finamente molido es una composición de partículas de las que más del 80% tienen un tamaño de partícula (diámetro) de menos de 0,2 mm.
- 25 Preferiblemente, el polvo es seco y fluye libremente. Con la expresión "polvo que fluye libremente" se quiere decir un polvo (obtenido mediante molienda, microgranulación o técnica similar) del que las partículas no se adhieren entre sí. Todos los polvos que muestran un ángulo de reposo por debajo de aproximadamente 50 grados normalmente muestran propiedades de flujo adecuadas, pero tal como se usa en el presente documento, los términos seco y que fluye libremente, también se referirán al aspecto macroscópico del polvo (lo que significa que el polvo tiene aspecto
- 30 seco y fluye libremente).

- Un medio de cultivo celular según la presente invención es cualquier mezcla de componentes que mantiene y/o soporta el crecimiento *in vitro* de células. El medio de cultivo celular puede comprender todos los componentes necesarios para mantener y/o soportar el crecimiento *in vitro* de células o sólo algunos componentes de modo que se añadan componentes adicionales por separado. Ejemplos de medios de cultivo celular según la presente
- 35 invención son medios completos que comprenden todos los componentes necesarios para mantener y/o soportar el crecimiento *in vitro* de células, complementos de medio o alimentos. En una realización preferida, el medio de cultivo celular es un medio completo.

Normalmente, los medios de cultivo celular según la invención se usan para mantener y/o soportar el crecimiento de células en un biorreactor.

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

- 45 Las células que van a cultivarse con los medios según la presente invención pueden ser células normales, células enfermas, células transformadas, células mutantes, células somáticas, células germinales, células madre, células precursoras o células embrionarias, cualquiera de las cuales pueden ser líneas celulares establecidas o transformadas o pueden obtenerse de fuentes naturales.

Un medio de cultivo celular que no comprende peptonas ni triptonas es un medio de cultivo celular que no contiene ninguna peptona ni triptona ni otros péptidos producidos por la hidrólisis parcial de proteínas.

En una realización preferida, el medio de cultivo celular que no comprende peptonas ni triptonas tampoco comprende ninguna proteína ni otros polímeros derivados de manera natural como agar. En una realización muy preferida, el medio de cultivo celular que no comprende peptonas ni triptonas es un medio de cultivo celular definido químicamente.

- 5 Los medios de cultivo celular definidos químicamente son medios de cultivo celular que no comprenden ninguna sustancia indefinida químicamente. Esto significa que se conocen la estructura y la composición química de todos los productos químicos usados en los medios definidos químicamente. Los medios definidos químicamente no comprenden ningún tejido de planta, animal o levadura; no comprenden células alimentadoras, suero, extractos o digestos u otros componentes que pueden contribuir con proteínas escasamente definidas químicamente a los
10 medios. Estructuras químicas indefinidas químicamente o escasamente definidas son aquellas cuya estructura y composición química no se conocen o sólo podrían definirse con enorme esfuerzo experimental (comparable a la evaluación de la estructura y la composición química de una proteína como albúmina o caseína).

- 15 En una realización, el medio de cultivo celular que no comprende peptonas ni triptonas sólo contiene uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

El tamaño de una partícula significa el diámetro medio de la partícula. El diámetro de partícula se determina mediante dispersión de luz láser en aceite de silicona.

Los componentes de sacárido son todos mono o disacáridos, como glucosa, galactosa, ribosa o fructosa (ejemplos de monosacáridos) o sacarosa, lactosa o maltosa (ejemplos de disacáridos).

- 20 Ejemplos de aminoácidos según la invención son aminoácidos proteinogénicos, especialmente los aminoácidos esenciales, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, así como los aminoácidos no proteinogénicos como D-aminoácidos.

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

- 30 Ejemplos de sales son componentes que comprenden iones inorgánicos tales como bicarbonato, calcio, cloruro, magnesio, fosfato, potasio y sodio u oligoelementos tales como Co, Cu, F, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Ni, Bi, V y Zn.

Ejemplos de tampones son CO₂/HCO₃, HEPES, PIPES, ACES, BES, TES, MOPS y TRIS.

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

- 35 Los componentes de ácido nucleico, según la presente invención, son las bases de nucleótidos, como citosina, guanina, adenina, timina o uracilo, los nucleósidos como citidina, uridina, adenosina, guanosina y timidina, y los nucleótidos como adenosina monofosfato o adenosina difosfato o adenosina trifosfato.

- 40 Un medio de cultivo celular estable es un medio que tras el almacenamiento a lo largo de un determinado periodo de tiempo muestra al menos el 80% preferiblemente al menos el 90%, más preferido al menos el 97%, lo más preferido la misma actividad biológica y bioquímica cuando se compara con un medio recién preparado de la misma formulación.

La presente invención se basa en el hallazgo de que los medios que no comprenden peptonas ni triptonas ni componentes similares también pueden proporcionarse en forma granulada seca. Esto fue muy inesperado ya que hasta ahora sólo podrían granularse en seco medios de cultivo celular con peptonas o triptonas. Se suponía que las propiedades adhesivas de las peptonas o triptonas eran esenciales para la producción de medios granulados secos.

- 45 Se ha encontrado que un procedimiento de compactación especial también permite la producción de medios granulados secos que no comprenden peptonas ni triptonas.

El procedimiento de compactación se realiza en dos etapas básicas

- a) proporcionar un medio de cultivo celular en forma de un polvo mixto de los componentes de medio

b) compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos

5 En la etapa a), se proporciona un polvo seco finamente molido de los componentes de medios. Todos los componentes se mezclan minuciosamente de modo que todas las partes de la mezcla en polvo tienen casi la misma composición. La mezcla debe tener la misma calidad con respecto a su uniformidad de composición que un medio de cultivo celular en polvo seco comercial. Cuanto mayor es la uniformidad de la composición, mejor es la calidad del medio granulado seco resultante con respecto al crecimiento celular homogéneo. Molinos que son adecuados para producir polvos molidos finos son por ejemplo molinos de bolas, molinos de pásas, molinos de chorro o molinos de tamizado por paleta rotatoria. El tamaño de partícula de los polvos es normalmente inferior a 500 μm , preferiblemente inferior a 200 μm .

10 Para proporcionar un polvo mixto de los componentes de medio, los componentes por ejemplo pueden mezclarse primero y luego molerse finalmente como una mezcla o pueden molerse por separado o en subgrupos y combinarse y mezclarse después.

15 Preferiblemente, todos los componentes de la mezcla son secos. Esto significa que si comprenden agua, sólo comprenden agua de cristalización pero no más del 5%, preferiblemente no más del 2%, lo más preferido no más del 1% en peso de moléculas de agua no unidas o no coordinadas.

Si uno o más de los componentes de la mezcla es/son sensible(s) a la oxidación, el mezclado y la molienda pueden realizarse bajo un gas protector inerte.

En la segunda etapa, la etapa b), se compacta la mezcla en polvo en una prensa de rodillos.

20 Un experto en la técnica conoce una prensa de rodillos, también denominada compactador de rodillos. Normalmente una prensa de rodillos comprende dos rodillos contrarrotatorios que están ubicados a una pequeña distancia de aproximadamente 0,5 a 3 mm, preferiblemente de 1 a 2 mm uno junto al otro. Las prensas de rodillos adecuadas normalmente tienen rodillos con anchuras de entre 10 y 50 cm dando como resultado un espacio entre los rodillos que tiene una longitud de entre 10 y 50 cm. No obstante, el tamaño de los rodillos y por tanto la longitud del espacio entre los rodillos puede variar dependiendo del tamaño de la prensa de rodillos. En una realización preferida, el espacio tiene una longitud de entre 10 y 15 cm.

El material en polvo mixto se extrae entre medias de los rodillos contrarrotatorios y se compacta en el espacio entre los rodillos. La distancia entre los rodillos y su estructura superficial influyen en el tamaño y la estructura finales de las partículas granuladas resultantes.

30 La superficie de los rodillos es preferiblemente ondulada. Las ondulaciones ayudan a hacer que el polvo se pegue al rodillo y a tirar de él a través de la prensa.

La capacidad de prensa de la prensa de rodillos normalmente es de entre 20 y 150 kN/cm de anchura de rodillo, preferiblemente los rodillos se prensan juntos con una fuerza de entre 30 y 80 kN, lo más preferido de entre 40 y 60 kN.

35 Si los componentes del medio de cultivo celular son muy sensibles, el procedimiento de compactación puede realizarse bajo una atmósfera de gas protector inerte. Además, los rodillos de la prensa de rodillos se enfrían habitualmente para mantener una temperatura constante puesto que a menudo algunos componentes son sensibles al calor y no soportarían la temperatura ligeramente aumentada que podría producirse debido a la compactación.

40 En una realización preferida, el medio de cultivo celular compactado que se libera de la prensa de rodillos se dimensiona directamente. Esto puede realizarse por ejemplo mediante tamizado, por ejemplo con uno o más tamices vibrantes. El diámetro de los orificios en el tamiz depende del tamaño de los gránulos que van a recogerse. Para el procedimiento según la presente invención, un diámetro típico es de entre 0,5 y 5 mm, preferiblemente de alrededor de 1 a 3 mm. Especialmente si la granulación en seco en la prensa de rodillos da como resultado copos o productos compactos más grandes, preferiblemente, se usa un molino de tamizado para granular los copos o productos compactos para dar gránulos de tamaño adecuado. Un molino de tamizado adecuado es el molino de tamizado oscilante, tipo FC 200, Bepex GmbH, con un tamaño de tamiz de entre 1 y 3 mm.

Las prensas de rodillos que son adecuadas para el procedimiento según la presente invención, pueden adquirirse por ejemplo de Alexanderwerk, Sahut Coreur, Hosokawa o Fitzpatrick Company.

50 Tal como ya se ha explicado, el tamaño de las partículas del medio de cultivo celular granulado seco depende de la manera en que se trata el medio compactado que sale de la prensa de rodillos. Si el medio se recoge directamente de la prensa de rodillos, normalmente comprende copos o productos compactos más grandes. Si el medio se tamiza, el tamaño de partícula se determina por el tamaño del tamiz. Pero también la manipulación adicional como el

envasado normalmente influye en el tamaño de partícula medio, ya que algunas partículas de los medios de cultivo celular granulados podrían dividirse en porciones.

En una realización preferida, tras la compactación y el tamizado, más del 80% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.

- 5 En una realización muy preferida, más del 90% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.

10 Se ha encontrado que la calidad de los medios de cultivo celular granulados puede mejorarse adicionalmente si la fracción de los medios compactados que se libera de la prensa de rodillos que tiene tamaños de partícula menores de 0,5, preferiblemente menores de 0,2 mm, vuelve a introducirse de nuevo de manera continua en la alimentación de la prensa de rodillos para volver a mezclarse con la mezcla en polvo y para volver a prensarse. Esto reduce la fracción de polvo del medio de cultivo celular granulado seco final y mejora adicionalmente la homogeneidad del producto.

15 La figura 1 da una vista esquemática de un posible conjunto de producción. La prensa de rodillos se muestra como rodillo R1 y rodillo R2. La mezcla en polvo P1 se alimenta desde un depósito al interior de la prensa de rodillos. La mezcla compactada que se libera de la prensa de rodillos se dimensiona con el tamiz S. La fracción de producto se retira para tratamiento y envasado adicional, la fracción de polvo P2 que tiene un tamaño de partícula inferior a 0,2 mm vuelve a introducirse de manera continua en la alimentación de la prensa de rodillos.

Se ha encontrado que la granulación en seco puede realizarse sin la adición de sustancias para aumentar la pegajosidad de la mezcla.

- 20 El medio de cultivo celular granulado seco resultante puede procesarse entonces adicionalmente. El medio puede envasarse y/o esterilizarse. Un experto en la técnica conoce recipientes adecuados. Ejemplos son bolsas, cajas, botellas, cajas de cartón, formas envasadas al vacío, etc. El envasado puede realizarse antes o después de la esterilización. Se prefiere radicación gamma tras el envasado apropiado.

25 Los medios de cultivo celular granulados secos también pueden usarse de manera favorable para la producción de otras formas de medios compactados como comprimidos o copos más grandes. Para ello, los medios de cultivo celular granulados secos se someten a compactación adicional en una prensa adecuada, por ejemplo una prensa de comprimidos. El medio granulado puede usarse tal cual sin la adición de otros componentes o puede mezclarse con otros componentes como adyuvantes de preparación de comprimidos o puede mezclarse o recubrirse más tarde con componentes específicos por ejemplo para comprimidos de liberación lenta. Por otra parte, el medio de cultivo celular granulado seco puede mezclarse con componentes que soportan la disolución rápida de los comprimidos, como bicarbonato de sodio.

Los medios de cultivo celular que se compactan o se granulan en seco normalmente comprenden al menos uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas o precursores de vitamina, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico.

- 35 Los medios también pueden comprender ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos y/o ácido plurónico y/o componentes tensioactivos como surfactantes no iónicos preparados químicamente. Un ejemplo de un surfactante no iónico adecuado son surfactantes de copolímero de bloque difuncional que terminan en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo disponibles con el nombre comercial Pluronic® de BASF, Alemania.

40 Los medios granulados secos pueden usarse para los mismos fines que los medios en polvo o los medios líquidos conocidos en la técnica. Pueden usarse preferiblemente en la producción de productos biofarmacéuticos ya que también pueden manipularse fácilmente grandes cantidades de medios granulados sin las desventajas comentadas para los medios en polvo.

- 45 Para su uso, se añade un disolvente, preferiblemente agua (lo más particularmente agua destilada y/o desionizada o agua purificada o agua para inyección) o un tampón acuoso a los medios granulados secos y los componentes se mezclan hasta que el medio se disuelve totalmente en el disolvente.

El disolvente también puede comprender solución salina, iones ácidos o básicos solubles que proporcionan un intervalo de pH de 1,0-10,0, estabilizadores, surfactantes, conservantes y alcoholes u otros disolventes orgánicos polares.

- 50 También es posible añadir sustancias adicionales como sustancias tampón para el ajuste del pH, suero bovino fetal, azúcares etc., a la mezcla del medio de cultivo celular y el disolvente. Entonces se pone en contacto el medio de cultivo celular líquido resultante con las células para hacerlas crecer o mantenerlas.

Los medios granulados secos son fáciles de manipular. En comparación con los medios en polvo, la cantidad de polvo que forma cuando se manipulan los medios se reduce significativamente.

- 5 Los medios pueden disolverse fácilmente en disolventes. La reconstitución es rápida, preferiblemente menos de 30 minutos, más preferiblemente menos de 15 minutos. La composición de los medios granulados secos permanece homogénea, incluso en caso de agitación o vibración durante el transporte.

Además, a diferencia de los medios granulados en húmedo, las condiciones de granulación en seco más suaves permiten el procesamiento directo y fácil de los medios que comprenden incluso sustancias sensibles al calor y/o la oxidación como vitaminas (por ejemplo vitamina B1), glucosa, tiamina, sales de hierro o componentes que comprende enlaces disulfuro.

- 10 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, sin embargo, sin limitarse a los mismos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos representan aplicaciones prácticas de la invención.

1. Compactación en seco en medio Eagle modificado de Dulbecco

- 15 El medio Eagle modificado de Dulbecco, también conocido como DMEM, es un medio usado a menudo para hacer crecer células animales. Los componentes de DMEM son en mg/l:

Sales inorgánicas:

<u>CaCl₂</u> (libre de agua):	200,00
<u>Fe(NO₃)₃</u> 9 H ₂ O:	0,10
<u>KCl</u> :	400,00
<u>MgSO₄</u> (libre de agua):	97,67
<u>NaCl</u> :	6400,00
<u>NaH₂PO₄</u> H ₂ O:	125,00

Otros componentes:

D-Glucosa:	4500,00
<u>Rojo fenol</u> :	15,00
Piruvato de sodio:	110,00

Aminoácidos:

L-Arginina HCl:	84,00
L-Cistina 2HCl:	63,00
L-Glutamina:	584,00
Glicina:	30,00
L-Histidina HCl H ₂ O:	42,00
L-Isoleucina:	105,00
L-Leucina:	105,00
L-Lisina HCl:	146,00
L-Metionina:	30,00
L-Fenilalanina:	66,00
L-Serina:	42,00
L-Treonina:	95,00
L-Triptófano:	16,00
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O:	104,33
L-Valina:	94,00

Vitaminas:

D-Pantotenato de calcio:	4,00
Cloruro de colina:	4,00
<u>Ácido fólico</u> :	4,00
i-Inositol	7,20
Niacinamida	4,00
<u>Riboflavina</u>	0,40
Tiamina HCl:	4,00

Todos los componentes del medio DMEM se mezclan y se muelen en un molino de púas para dar un polvo seco

ES 2 565 349 T3

homogéneo. Se alimentan 30 kg del polvo al interior de una prensa de rodillos con las siguientes características:

- rodillos planos cóncavos
 - distancia entre los rodillos: 1,5 mm
 - longitud del espacio entre los rodillos: 10 cm
- 5 - fuerza de prensado: 50 kN

El material resultante muestra un alto porcentaje de productos compactos más grandes. Se tamiza el material resultante en un molino de tamizado oscilante, tipo FC 200, Bepex GmbH, con un tamaño de tamiz de 3 mm.

Se vuelve a introducir la fracción de gránulos con un tamaño (diámetro) inferior a 0,2 mm en la prensa de rodillos. Se obtiene un medio DMEM granulado seco, teniendo más del 75% de los gránulos tamaños de entre 1 y 3 mm.

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas que puede prepararse mediante
- 5 a) proporcionar un medio de cultivo celular que comprende uno o más componentes de sacárido, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más sales, uno o más componentes de tampón, uno o más cofactores y uno o más componentes de ácido nucleico, en forma de un polvo mixto de los componentes de medio, por lo cual el medio no comprende peptonas ni triptonas
- b) compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos,
caracterizado porque la etapa b) se realiza mediante
- 10 b1) compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos
- b2) volver a introducir todas las partes del medio de cultivo celular compactado obtenido en la etapa b1) que tienen un tamaño de partícula menor de 0,5 mm en el medio de cultivo celular en forma de un polvo mixto de los componentes de medio que va a llenarse en la prensa de rodillos para cultivar células mediante:
- 15 a) disolver el medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas en un disolvente para formar un medio de cultivo celular líquido
- b) poner en contacto dicho medio de cultivo celular líquido con dichas células que van a cultivarse.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas es un medio de cultivo celular de mamífero.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la capacidad de prensa de la prensa de rodillos es de entre 30 y 80 kN/cm de anchura de rodillo.
- 20 4. Uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el tamaño del espacio entre los rodillos de la prensa de rodillos es de entre 0,5 y 3 mm.
5. Uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque en una etapa c), el material obtenido a partir de compactar dicho polvo mixto en una prensa de rodillos se procesa adicionalmente en un molino de tamizado.
- 25 6. Uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque más del 80% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.
7. Uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque más del 90% de las partículas del medio de cultivo celular granulado tienen un tamaño mayor de 0,5 mm.
- 30 8. Uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el disolvente para disolver el medio de cultivo celular granulado seco que no comprende peptonas ni triptonas para formar un medio de cultivo celular líquido es agua.

Fig. 1

