

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 324**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010** **E 14187810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2826854**

54 Título: **Medios para cultivo de células de mamíferos que comprenden sobrenadante de etapas del fraccionamiento de Cohn y uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.07.2009 ES 200930526

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)
C/ Jesús y María, 6
08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**COSTA RIEROLA, MONTSERRAT;
DIEZ CERVANTES, JOSÉ MARIA y
JORQUERA NIETO, JUAN IGNACIO**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 619 324 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 para cultivo de células de mamíferos que comprenden sobrenadante de etapas del fraccionamiento de Cohn y uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un suplemento para su uso en medios de cultivo de células de mamíferos. Dicho suplemento se obtiene a partir del plasma desfibrinado (sustancialmente libre de fibrinógeno y fibrina) de origen humano y, cuando es adicionado como suplemento de medios de cultivo proporciona los diferentes nutrientes y factores para un adecuado mantenimiento y/o proliferación de células cultivadas.

Antecedentes

Los cultivos celulares se utilizan en la industria biotecnológica principalmente para la producción de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales. Recientemente también se ha desarrollado una tecnología para el cultivo de diferentes tipos de células troncales para su utilización en la terapia celular, en combinación o no con la terapia génica.

Para poder cultivar y mantener con éxito las diferentes líneas celulares se necesita un medio que imite las condiciones del medio interno donde se encontrarían estas células *in vivo*. Generalmente, el medio de cultivo consta de un medio basal que garantiza el pH, los nutrientes y las sales y se pueden añadir una serie de suplementos que permiten la proliferación celular. Uno de los suplementos más utilizados es el suero sanguíneo de origen animal. El origen animal de este suero puede implicar serias restricciones para su utilización en la obtención de productos para uso en humanos, ya que al reconocer los residuos de origen animal como antígenos extraños se pueden originar reacciones adversas en los receptores. Además, los sueros animales poseen el inconveniente de que su composición no es definida, pues existe una gran variabilidad entre fabricantes por el uso de diferentes razas animales. También, debido al procedimiento de obtención, existe una gran variabilidad lote a lote, lo que implica que puedan ocurrir grandes variaciones en la capacidad de crecimiento y en la producción de un cultivo determinado.

La principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar el medio natural, como extractos embrionarios, hidrolizados de proteína o sueros. Un primer grupo de medios, tales como el medio basal de Eagle (MEM) (Eagle, H. (1955). "The specific amino acid requirements of mammalian cells (strain L) in tissue culture". J. Biol. Chem. 214 : 839.) y el más complejo 199 de Morgan y col. (Morgan, J.G., Morton, J.H. y Parker, R.C. (1950). "Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73 : 1.) eran medios definidos pero que precisan de un suplemento de suero entre el 5 y el 20%.

A fin de eliminar el aporte de medios complejos no definidos se han ido formulando medios más complejos como NCTC 109 (Evans, V.J., Bryant, J.C., Fioramonti, M.C., McQuilkin, W.T., Sanford, K.K., y Earle, W.R. (1956), "Studies of nutrient media for tissue C cells in vitro. I A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells". Cancer Res. 16 : 77.), 135 (Evans, V.J. y Bryant, J.C. (1965). "Advances in tissue culture at the National Cancer Institute in the United States of America". En "Tissue culture", edit. por C.V. Ramakrishnan (ed.). W. Junk. The Hague. pp. 145-167.), Ham F10 y F12 (Ham, R.G. (1963). "An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines". Exp. Cell Res. 29 : 515., Ham, R.G. (1965). "Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium". Proc. Natl. Sci. USA 53 : 288.), serie de los MCDB (Ham, R.G. y McKeehan, W.L. (1978). "Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells". In vitro 14 : 11-22.) y los medios de Sato suplementados con hormonas (Barnes, D. y Sato, G. (1980). "Methods for growth of cultured cells in serum free-medium". Anal. Biochem. 102 : 255-270).

La aproximación recomendada para establecer un medio definido es empezar con un medio rico, por ejemplo Ham F12, suplementado con elevada concentración de suero (20%) y probar suplementos que permitan reducir la cantidad de suero hasta poderla reducir o suprimir.

Después de años de investigación en la composición de los medios, la elección de éstos sigue siendo empírica.

Los principales medios empleados y sus aplicaciones son:

- Medio Basal de Eagle (EBM): es un medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10%. Se utiliza para el crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.

- Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM): es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).

- R.P.M.I. 1640: es un medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.

- Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM): contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT (hipoxantina-aminopterin-timidina) o HT (hipoxantina-timidina).

5 - Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM): es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, entre otros elementos. Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.

- McCoy 5ª: es un medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides tanto de rata como humanas.

10 - Medio L-15 de Leibovitz: es un medio utilizado para el cultivo de virus.

- Medio F-10 de Ham: es un medio utilizado para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn. Es útil para el cultivo de células amnióticas.

15 - Medio F-12 de Ham: es un medio útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero.

20 - Medio 199: es un medio muy utilizado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomopatías.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos :

1. Soluciones salinas equilibradas (BSS).
2. Aminoácidos.
3. Vitaminas.
4. Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular (nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos).
5. Hormonas y factores de crecimiento (suero).
6. Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

En los medios no definidos, las hormonas y factores de crecimiento suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternera ("calf serum", CF), suero bovino fetal ("fetal calf serum", FCS), suero de caballo ("horse serum", HS) y suero humano ("human serum", HuS). El más utilizado es el suero de ternera, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas.

La utilización de suero es problemática pues a pesar de que la composición del suero es conocida en parte, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables que pueden influir notablemente en el cultivo. Además, el suero varía de lote a lote, debido a la variabilidad de la propia técnica de obtención de la sangre, del proceso de obtención del suero (coagulación de la sangre) y de las condiciones de separación del suero, así como la diferencia entre las distintas fuentes de suero. Además, cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos. Por otra parte, si se deben purificar productos del medio de cultivo, la presencia de componentes variables en el suero dificulta notablemente estos procesos.

45 Algunos factores séricos, como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), estimulan la proliferación de fibroblastos, lo que puede ser un problema en el establecimiento de cultivos primarios especializados, especialmente si se produce una gran variación en su contenido.

En conjunto, la inclusión de suero en los medios de cultivo supone un gran inconveniente para la estandarización de protocolos experimentales y de producción de células. Por ello se realizan importantes esfuerzos para el establecimiento de medios de composición definida para el crecimiento celular. Esto, además de la reproducibilidad buscada, permite establecer medios selectivos en los que crezca el tipo celular deseado. La desventaja de estos medios es que en muchos casos el crecimiento de las células es menor y las líneas celulares permanecen viables menos generaciones.

Se han realizado diferentes intentos para conseguir suplementos de los medios de cultivo celulares que eviten los problemas que representan los sueros empleados en la actualidad. Entre ellos se han ensayado diferentes fracciones procedentes del plasma humano y existen importantes contradicciones en el estado de la técnica en cuanto a la utilidad de las diferentes fracciones del plasma humano.

De forma general, se han ensayado diferentes fracciones del plasma humano procedentes del fraccionamiento plasmático según el método de Cohn (Cohn E.J. et al; J Am Chem Soc, 1946) y variaciones del mismo (Kistler and Friedli, Nischmann; en Curling, JM ed, Methods of plasma fractionation. Academic Press 1980), estando todos estos ensayos dirigidos al uso de los diferentes precipitados obtenidos en el fraccionamiento, especialmente las fracciones II+III, III, IV (IV₁ ó IV₄) y V, o sus equivalentes en las diferentes variaciones del método de fraccionamiento.

El objetivo inicial de la separación de las mencionadas fracciones (precipitado) es la obtención de un precipitado enriquecido en una determinada proteína, como punto de partida para la purificación de la misma, por ejemplo γ -globulinas y α y β -globulinas en el caso de las fracciones II+III ó III; α -globulinas y transferrina en la fracción IV y albúmina en la fracción V. Por ello en estas fracciones se presenta de forma mayoritaria un único tipo de proteína, estando presente otras proteínas como impurezas, generalmente en mucha menor cantidad. El uso de estas fracciones en cultivos celulares implica la adición al medio de cultivo de un tipo de proteína mayoritaria y de una variedad de proteínas que la acompañan como impurezas, entre las cuales se deben situar las que requieren las células en el medio de cultivo para que el uso de dicho material tenga éxito. Esta ha sido hasta la actualidad una forma obvia pero ineficiente de suplementar los medios de cultivos celulares. Seguramente esta sea la causa de la disparidad de resultados obtenidos, ya que pequeñas variaciones en el método de fraccionamiento no variarán significativamente la recuperación de la proteína mayoritaria, pero podrán introducir gran variabilidad en la recuperación de las diferentes proteínas acompañantes. Por ejemplo, la obtención de la fracción II+III, según el método de Cohn, se realiza a una concentración de etanol de entre 20 y 25% a -5°C y pH 6,9. Según el método de Nitschmann, partiendo de un material equivalente, se precipita a una concentración de etanol de 19% a -5°C y pH 5,8. Con esta variación de pH se obtienen fracciones con características diferentes, especialmente en el contenido de γ -globulinas y otras proteínas acompañantes.

Por otra parte la utilización de sobrenadantes, comparada con la utilización de fracciones precipitadas, presenta las ventajas adicionales, entre otras, de que mantiene una elevada concentración de albúmina en el medio y, sobre todo, evita la pérdida de componentes (p.ej., hormonas, citoquinas, lípidos...) que son importantes para el crecimiento celular y que podrían no estar presentes en los precipitados o bien perder su funcionalidad (inactivarse) en presencia de concentraciones de alcohol superiores al 20%, como las empleadas para precipitar la fracción II+III en determinadas condiciones (25%) o las fracciones IV₁+IV₄ y V (40% de etanol).

El documento EP0143648 (Macleod) describe el uso de las fracciones II+III, III, IV₁ y IV₄ como suplemento de los medios de cultivo en sustitución del suero animal. También indica que ni la fracción II ni la fracción V presentan utilidad para este uso. En todos los casos, este documento se refiere exclusivamente a las fracciones precipitadas en el fraccionamiento de Cohn o sus variantes. Además, este documento da a conocer un proceso para obtener el material adecuado como suplemento de medios de cultivo a partir de las fracciones anteriormente mencionadas. Este proceso consiste básicamente en la suspensión del precipitado en agua y homogenización del mismo. Posteriormente, se procede a ajustar el pH para conseguir una mejor disolución de las proteínas y para llevarlo a las condiciones fisiológicas que permitan el crecimiento de las células. Por otro lado, este proceso contempla, además, la eliminación de la γ -globulina presente mediante precipitación con polietilenglicol y la separación del material de bajo peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular. Por lo tanto, la eficacia del material preparado de esta manera es muy dependiente del proceso específico de preparación.

En otro documento de Macleod (Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Vol. 37; 1988) indica que las fracciones II, III y IV producen poco o ningún efecto en el crecimiento celular, debido posiblemente a la presencia de inhibidores del crecimiento y dirige la atención a la fracción IV₄ como material ideal para suplementar medios de cultivo.

La EP 0 440 509 (Macleod) describe un suplemento para medios de cultivo celulares basado en la fracción IV o en la fracción II+III de Cohn, y el proceso para su obtención. Mediante el proceso descrito se obtiene un producto sustancialmente libre de inmunoglobulinas, inactivado de virus y estable. Se procede a la separación de la inmunoglobulina por precipitación con Polietilenglicol y a la inactivación de virus por pasteurización, en presencia de sorbitol como estabilizante. Este proceso es especialmente aplicable a la fracción IV (IV₁ ó IV₄).

El documento EP 0264748 (Antoniades) describe el sobrenadante de la fracción V de Cohn como suplemento de medios de cultivo celulares en sustitución del suero animal. Según este documento, la ventaja de este material es que no tiene coste y que puede ser calentado a 60°C durante 20 horas.

El sobrenadante de la fracción V es el material final de desecho del fraccionamiento de Cohn, por lo que su uso obviamente no presenta un coste económico como detrimento en el rendimiento de dicho fraccionamiento. Este material presenta un alto contenido de etanol (40%), que es altamente tóxico, y que en este documento no se menciona como debe ser eliminado. Por otra parte, para el tratamiento descrito a 60°C debería ser necesaria la estabilización de la proteína presente, pero también se obvia este detalle en el documento, con lo que la invención es difícilmente realizable tal y como está descrita. Tampoco debe despreciarse el efecto desnaturalizante del etanol a una concentración tan elevada como este caso.

La solicitud de Patente PCT WO 94/18310 (Mankarious) describe un método para producir un suplemento de los medios de cultivo celulares a partir de la fracción IV₄ de Cohn. Este método contempla la suspensión de la fracción IV₄ y posterior clarificación y también la inactivación o eliminación de virus, por pasteurización y/o filtración.

La patente GB 2 166 756 A describe un método para el cultivo de células de bazo para la producción de interferón. Este método se basa en un medio de cultivo RPMI que es suplementado con una fracción sérica obtenida a partir de suero o plasma al que se ha eliminado el fibrinógeno y que se caracteriza por que se le ha extraído la prealbúmina y

las gammaglobulinas (pág. 1, líneas 30-34). En una realización preferente, esta fracción se purifica por precipitación con alcohol entre el 10 y el 20 %, a un pH de 5.85 (pág. 1, líneas 37-38). En una realización particular (obtención de la fracción EPF), el sobrenadante usado como medio de cultivo se obtiene a una concentración de etanol del 19 % a un pH de 5.85 (pág. 2, líneas 44-45). El sobrenadante obtenido se dializa con objeto de eliminar el etanol, siendo posteriormente liofilizado para su conservación. Opcionalmente se liofiliza sin diálisis previa, con lo que también se elimina el etanol. Según los inventores, con un medio de cultivo (RPMI) suplementado con dicha fracción se obtiene una excelente producción de interferón. En la precipitación alcohólica del plasma, las condiciones de proceso (concentración de etanol, pH, fuerza iónica del medio, temperatura y concentración de proteína) deben fijarse cuidadosamente para mantener en solución determinadas proteínas e insolubilizar otras con objeto de que precipiten y así proceder a su separación. Variaciones en alguna o algunas de las mencionadas condiciones producirán diferencias importantes en el producto obtenido, siendo la concentración de etanol y el pH, los factores determinantes de la composición del precipitado y sobrenadante obtenidos.

Se han realizado otros intentos de suplementar medios de cultivo celulares a partir de suero o fracciones séricas de origen humano, en sustitución del suero fetal bovino, como muestran los documentos WO 2004/055174, EP 1820852 ó CA 1177424. El suero obtenido a partir de sangre total, o a partir de plasma, no puede equipararse a una fracción plasmática concretamente definida y caracterizada y presenta el inconveniente de la falta de reproducibilidad lote a lote. Además, ninguno de estos documentos consigue definir y caracterizar la composición exacta del material utilizado. De esta manera, se siguen presentando gran parte de los problemas asociados al uso del suero de origen animal.

Kwok y otros dieron a conocer el uso de plasma de embarazadas en sustitución del suero fetal bovino para el cultivo de un tipo específico de células, atribuyendo su efecto a la presencia de factores desconocidos. De igual manera, postula un efecto sinérgico de la albúmina humana en ese tipo de cultivo. Es evidente para un experto en la materia que con el uso de plasma de embarazadas se busca la presencia de factores de crecimiento celular equiparables a los del suero fetal, pero la homogeneidad de este material no es comparable a las mezclas de plasma de miles de donantes, según se describe más adelante.

Como se ha descrito anteriormente, se han realizado numerosos intentos para sustituir el suero animal como suplemento de medios para el cultivo celular. Una parte de estos intentos se ha realizado a partir de fracciones de plasma humano, especialmente de fracciones del método de Cohn. A pesar de ello, en la actualidad se sigue utilizando comúnmente el suero animal como suplemento de medios de cultivo de células de mamíferos y se ha fracasado en los intentos de sustituirlo por un derivado del plasma humano.

Por todo lo anteriormente mencionado, se deduce que en el estado de la técnica actual no se dispone de un material de origen humano que sea útil como suplemento de medios de cultivo celulares, que sea, además, seguro frente a la transmisión de agentes patógenos, que pueda ser obtenido a escala industrial con un coste y un rendimiento aceptable, que presente una adecuada uniformidad lote a lote y que tenga una calidad de grado farmacéutico.

Descripción de la invención

Los inventores han realizado investigaciones encaminadas a la sustitución del suero de origen animal como suplemento de medios de cultivo por fracciones del plasma humano y han encontrado, de manera sorprendente, que partiendo de un sobrenadante del fraccionamiento de Cohn, específicamente el sobrenadante de la fracción I, es posible suplementar medios de cultivo celulares, obteniendo excelentes resultados en cuanto a crecimiento celular. El uso de este material soluciona los problemas antes mencionados, ya que es de origen humano, se obtiene de forma industrial bajo normas de correcta fabricación (GMPs), con un coste y rendimiento aceptables, presenta una adecuada uniformidad y reproducibilidad lote a lote y posee una calidad de grado farmacéutico. Además, este material puede ser tratado con métodos que eviten la transmisión de patógenos.

Para la preparación de estos derivados se procede según se describe a continuación.

En primer lugar, se obtiene plasma humano de donantes sanos al que se añade una solución anticoagulante conteniendo, en una utilización preferente de la invención, solamente citrato sódico en cantidad suficiente para evitar la coagulación del plasma. La adición de sustancias (p.ej.: carbohidratos como la glucosa) destinadas a la mejor conservación de las células sanguíneas no es imprescindible, puesto que el plasma empleado en la invención está sustancialmente libre de células, al poderse haber obtenido por plasmaféresis en presencia de anticoagulante, en lugar de por donación de sangre total.

Las cantidades de anticoagulante, así como otras normativas que debe cumplir el procedimiento de obtención, almacenamiento y manipulación de plasma humano están descritas en normativas internacionales de carácter público que afectan a la industria fraccionadora del plasma humano, como son, por ejemplo, el "Code of Federal Regulations" de los EE.UU. de América, las directrices y normativas de la Administración Federal de los Fármacos y Alimentos de los EE.UU. de América (Food and Drug Administration, FDA) y de la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (European Medicines Evaluation Agency, EMEA), así como en las directrices y normativas de la Conferencia Internacional de Armonización farmacéutica (International Conference of Harmonization, ICH) y de las

farmacopeas internacionales, por ejemplo, las Farmacopeas Europea, japonesa o de los EE.UU. de América, e incluyen también las normas conocidas como Normas de Correcta Fabricación actuales (current Good Manufacturing Practices, cGMP). En adelante este conjunto de normativas se referirán como “el conjunto de normativas que afectan al fraccionamiento del plasma humano con fines farmacéuticos”. Dicho conjunto de

Una vez obtenido el plasma humano, se congela, almacena y transporta de acuerdo con el conjunto de normativas que afectan al fraccionamiento del plasma humano con fines farmacéuticos y, en una utilización preferente de la invención, específicamente de acuerdo con los requerimientos de la monografía 0853 de la Farmacopea Europea. Cada unidad (donación) de plasma se analiza para descartar la presencia de marcadores de infección vírica en los donantes, que previamente han sido sometidos a cuestionarios y exámenes físicos de acuerdo con las normativas mencionadas anteriormente. En aplicación preferente de la invención, el plasma de un posible donante no se emplea hasta que el donante ha sido sometido al procedimiento de evaluación dos veces en un intervalo de tiempo inferior a 6 meses, momento en el que el donante pasa a estar “cualificado” (“qualified donor”).

En una aplicación preferente de la invención, muestras obtenidas de cada donación se analizan para descartar la presencia de marcadores de infección como, por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de hepatitis B y C (VHB y VHC) y otros virus patógenos para el hombre. Forma parte de la invención un almacenamiento controlado de las donaciones de plasma durante un periodo no inferior a 60 días, preferentemente no inferior a 90 días, que permitiría retirar donaciones previas si un donante, previamente sano, diese indicios, con posterioridad a la donación, de infección por agentes patógenos u otros factores de riesgo sanitario. En una aplicación preferente de la invención, los análisis de las muestras de cada donación se repiten una o varias veces tras preparar mezclas piloto (“minipools” o “pilot pools”) de un número variable de donaciones que, por ejemplo, pueden oscilar entre 10 y 10000, preferentemente entre 90 y 2000 y más preferentemente entre 100 y 1000. Para estas repeticiones de análisis se pueden emplear métodos de amplificación del material genético de los virus como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain reaction, PCR) u otros métodos incluidos genéricamente dentro de los conocidos como análisis de ácidos nucleicos (Nucleic Acid Testing, NAT).

Una vez completados todos los análisis y el periodo de almacenamiento controlado (inventory hold), tras descartar las unidades no aptas según los análisis, el plasma puede ser utilizado en las etapas siguientes de la invención.

La siguiente etapa consiste en descongelar donaciones, en número no inferior a 100 unidades, preferentemente superior a 1000 unidades y más preferentemente superior a 4000 unidades. La descongelación se puede realizar, en una aplicación preferente de la invención, entre 0 y 4 °C de temperatura. Las donaciones se mezclan durante el proceso de descongelación dando lugar a una mezcla plasmática (“plasma pool”). Opcionalmente, se puede separar un material que precipita, ya que es inestable debido al proceso de descongelación y que suele describirse como “crioprecipitado” y es rico en factor von Willebrand (FVW), factor VIII (FVIII), fibrinógeno (FBN), fibronectina (FNC) y otras proteínas.

A continuación, en una utilización preferente de la invención, se añade al plasma etanol (96 %) de grado farmacéutico hasta alcanzar una concentración de aproximadamente el 8 % (volumen/volumen). Para evitar la desnaturalización de proteínas debida al proceso exotérmico de disolución del etanol en el plasma, la adición se realiza con un caudal de adición controlado. Simultáneamente y con el mismo objetivo, la temperatura del pool de plasma se hace descender gradualmente hasta aproximadamente -2 °C. La presencia de etanol evita la congelación del plasma. En estas condiciones precipita una fracción de proteínas muy rica en Fibrinógeno y que incluiría la mayor parte de las proteínas presentes en el crioprecipitado si este, en una aplicación de la invención, no se hubiese separado con anterioridad a la adición de alcohol. Esta fracción se denomina genéricamente como fracción I (Fr-I) de Cohn, ya que se obtiene por un procedimiento esencialmente correspondiente al descrito por Edwin J. Cohn (Cohn E.J. et al; J Am Chem Soc, 1946). Cuando se separa el precipitado obtenido en esta etapa, la fracción sobrenadante se encuentra sustancialmente libre de fibrinógeno, y por tanto libre de cualquier interferencia que pudiera causar el fibrinógeno en los cultivos celulares, siendo adecuada para el objeto de la invención, como suplemento para medios de cultivo de células, una vez se elimina el alcohol añadido, por su toxicidad para las células.

Durante las etapas descritas se aplican controles del proceso de producción de los materiales derivados del plasma, para garantizar que los procesos se realizan dentro de las especificaciones requeridas en cuanto a concentración de proteína, pH, conteo de microorganismos, etc.

Este sobrenadante se obtiene por un procedimiento esencialmente correspondiente al descrito por Edwin J. Cohn, si bien pueden existir diferencias de composición, tanto debidas a los cambios de escala de producción (número de donaciones y volumen de los pools de plasma), como a variaciones entre el procedimiento de la invención y el procedimiento aplicado en aquella época.

Este sobrenadante obtenido directamente del fraccionamiento industrial del plasma humano (basado en el método de Cohn), aparte de la eliminación del etanol que contienen (aproximadamente 8% en el sobrenadante de la fracción I y 20-25% aproximadamente en el sobrenadante de la fracción II+III), no requieren tratamientos posteriores de

purificación.

La eliminación del etanol contenido en estos sobrenadantes puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferentemente puede realizarse mediante diálisis o diafiltración o directamente mediante liofilización, evaporación o desecación (p. ej. Spray drying) siendo estos métodos fácilmente industrializables.

Una forma de preparación válida para obtener un producto totalmente estable consiste en partir de cualquiera de los sobrenadantes descritos y, opcionalmente, diluirlos convenientemente con agua para inyección, solución salina fisiológica o tampón, a pH 7-8 y temperatura entre 2-8°C. La solución se clarifica por placas de celulosa o de profundidad, que sean inertes en cuanto a adsorción de proteína, y finalmente se clarifica hasta aproximadamente 0,5 micras de poro. Posteriormente se somete el producto a diafiltración, utilizando membranas de aproximadamente 10 kDa de corte molecular nominal, frente 2 volúmenes o más de agua para inyección, solución salina fisiológica o tampón, a un pH preferente de 7 aproximadamente. Preferentemente, el número de volúmenes de intercambio en la diafiltración es aproximadamente de 5.

La solución diafiltrada es clarificada por filtración absoluta con gradiente de filtros de 0,2 micras hasta 0,1 micras de tamaño de poro. Posteriormente el producto puede ser nanofiltrado por aproximadamente 35 nm y 20 nm de tamaño de poro, a una temperatura preferente de 2-8°C y a una presión transmembrana inferior o igual a 1 bar. La carga aplicada es preferentemente alrededor de 70 Litros/m² de área para el filtro de menor tamaño de poro.

El producto obtenido puede concentrarse por ultrafiltración hasta el mismo valor de concentración de proteína total del material de partida (sobrenadante), o más concentrado si se prefiere.

En cualquier caso, el material obtenido se dosifica en viales o botellas de vidrio y se guarda almacenado preferentemente a -30°C o temperatura inferior hasta el momento de su uso. Como paso previo a la dosificación del sobrenadante en viales, se puede proceder a realizar una filtración esterilizante, por un tamaño de poro entre 0,1 y 0,2 micras.

Este producto congelado puede asimismo liofilizarse, o someterse a otros tratamientos, para disponer de un producto desecado. El producto puede someterse a radiación gamma y, en estado desecado, puede conservarse preferentemente entre 2 y 8°C hasta su uso.

En el caso de no realizar la diafiltración del material de partida (S/Fr-I) y optar por la eliminación del alcohol directamente por liofilización, se dosifica a viales o botellas de vidrio. Previamente a la dosificación del sobrenadante en viales, se puede proceder a realizar una filtración esterilizante, por un tamaño de poro entre 0,1 y 0,2 micras. El material dosificado se congela preferentemente a temperatura menor o igual a -30°C, y se somete a liofilización y radiación gamma tal y como se conocen estas técnicas.

De manera opcional, este material puede ser tratado con métodos de eliminación/inactivación de agentes patógenos. De forma preferente se puede proceder a la irradiación del material, congelado o liofilizado con radiación gamma, entre 15 y 35 kilo-greys, obteniéndose con 25 kilo-greys el óptimo entre estabilidad de la composición y eliminación de virus.

El producto liofilizado puede almacenarse, preferentemente entre 2-8°C, durante largo período de tiempo.

Una forma de conservación preferente del material hasta su uso es como liofilizado en su envase final. De esta manera, puede procederse a su dosificación directa y se puede eliminar el etanol en el propio proceso de liofilización.

Este sobrenadante se añade a medios de cultivo convencionales libres de suero, que contienen sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, entre otros componentes necesarios para el crecimiento celular, como por ejemplo el medio F12 de Ham o el medio de Dulbecco modificado (DMEM).

El medio resultante puede ser utilizado para cultivar una gran variedad de células de mamíferos. Para ello son utilizadas técnicas y condiciones de cultivo convencionales, que son conocidas por un experto en la materia.

El sobrenadante liofilizado puede reconstituirse en medio de cultivo base, por ejemplo el medio F12 de Ham o en el medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), en agua destilada o desionizada y apirógena, o en soluciones salinas o tampones habituales de cultivo celular.

El sobrenadante reconstituido en medio de cultivo puede utilizarse para suplementar el medio de cultivo base añadiendo desde un 2% a un 50 % (v/v) de sobrenadante reconstituido, por ejemplo: 2 ml de Sobrenadante de fracción I reconstituido en medio a 98 ml de medio base (2%) otro ejemplo sería añadir 50 ml de sobrenadante de Fracción I reconstituido en medio a 50 ml de medio base (50 %).

El sobrenadante reconstituido en agua, soluciones salinas o tampones aptos para cultivo celular se recomienda adicionarlo al medio de cultivo base entre un 2% y un 20% (v/v) por ejemplo 20 ml de sobrenadante reconstituido en 80 ml de medio (20%). En el caso de ser necesario llegar a concentraciones del 50% (v/v) sería necesario adicionar el sobrenadante reconstituido a medio base doble concentrado (2X) por ejemplo añadir 50 ml de sobrenadante de fracción I en agua a 50 ml de medio base 2X.

El medio de cultivo suplementado puede utilizarse para las técnicas habituales de cultivo, este medio suplementado puede utilizarse directamente o filtrarse previamente por 0,22 µm.

En caso de material (sobrenadante) conservado congelado, previa a la adición al medio base, debe descongelarse. Una vez descongelado se recomienda adicionarlo al medio de cultivo base entre un 2% y un 20% (v/v). En el caso de ser necesario llegar a concentraciones del 50% (v/v) en la suplementación del medio sería necesario adicionar el sobrenadante de fracción I doble concentrado (2X).

El medio de cultivo suplementado puede utilizarse para las técnicas habituales de cultivo, este medio suplementado puede utilizarse directamente o filtrarse previamente por 0,22 µm.

Ejemplo 1

Preparación del sobrenadante de las fracciones I y II+III.

Se procede a la mezcla y descongelación de donaciones individuales de plasma procedente de plasmaféresis, la descongelación se realiza en un reactor a una temperatura controlada entre 0 y 4 °C. Se obtienen finalmente 3783 kg. de plasma.

Para la separación del crioprecipitado se procede a la centrifugación del plasma, entre 9000 y 12000 xg, manteniendo la temperatura de la centrifugación entre 0 y 4 °C.

Para proceder a la separación de la fracción I, se comprueba la concentración de proteína del sobrenadante de crioprecipitado (S/C), que debe ser del 5 % aproximadamente. Si es superior se diluye con agua para inyección. Asimismo se ajusta el pH a 7 aproximadamente.

Partiendo del S/C, se le adiciona etanol hasta una concentración del 8 % (volumen/volumen). La velocidad de adición del etanol debe ser lenta (menor o igual a 2 kg/min) y con agitación moderada para evitar la desnaturalización. Durante la adición del etanol se disminuye gradualmente la temperatura del sobrenadante, en el reactor de precipitación, hasta llegar a una temperatura final de -2 °C. El pH final debe situarse aproximadamente en 7.

Después de aproximadamente 2 horas de reacción se procede a la centrifugación para la separación de la Fracción I. Esta centrifugación se realiza entre 9000 y 12000 xg. El sobrenadante obtenido (S/Fr-I) se mantiene a una temperatura de entre 0 y -4 °C.

En este punto, o bien en el S/C, podría haberse extraído opcionalmente el Complejo de Protrombina, por cromatografía de intercambio iónico (Curling, JM ed, Methods of plasma fractionation. Academic Press 1980).

Para la separación de la fracción II+III, se procede al ajuste de pH del S/Fr-I a aproximadamente 7 y seguidamente se adiciona etanol para llevarlo al 20 % (volumen/volumen). La velocidad de adición del etanol debe ser lenta (menor o igual a 2 kg/min) y con agitación moderada para evitar la desnaturalización. Durante la adición del etanol se disminuye gradualmente la temperatura del sobrenadante, en el reactor de precipitación, hasta llegar a una temperatura final de aproximadamente -5 °C. El pH final debe situarse cercano a 7.

En este ejemplo, después de aproximadamente 6 horas de reacción se procede a la separación de la fracción II+III.

En este punto (sobrenadante de la fracción II+III), o en el S/C, o en el S/FrI puede procederse a la extracción opcional de la Antitrombina, por cromatografía de afinidad a heparina (Fernandez J. et al. Sangre 41(supl. 3) 42 (1996).

Ejemplo 2

Dosificación y Liofilización

Un sobrenadante de fracción II+III obtenido según el ejemplo 1, se diluye con agua para inyección a pH 7-8 y temperatura entre 2-8°C hasta una concentración de etanol del 8 %. La solución se clarifica por placas de celulosa hasta 0,5 micras de poro. Posteriormente se somete opcionalmente el producto a diafiltración para eliminar el etanol, utilizando membranas de polisulfona de 10 kDa de corte molecular nominal, frente a agua para inyección, a un pH de 7. El número de volúmenes de intercambio en la diafiltración es de 5.

La solución es clarificada por filtración absoluta con gradiente de filtros de 0,2 micras hasta 0,1 micras de tamaño de poro. Posteriormente el producto opcionalmente se nanofiltrar por 35 nm y 20 nm de tamaño de poro, con filtros de celulosa cupra-amonio, a una temperatura entre 2 y 8 °C y a una presión transmembrana inferior a 1 bar, hasta el bloqueo de los filtros como máximo.

El producto se concentra por ultrafiltración hasta el mismo valor de concentración de proteína total del material de partida y previa filtración esterilizante, por un tamaño de poro de 0.2 micras, se dosifica en viales de vidrio y se guarda almacenado a -30 °C hasta el momento de su uso.

Este producto congelado puede liofilizarse para disponer de un producto desecado que se somete a radiación gamma y puede conservarse entre 2 y 8°C hasta su uso.

Ejemplo 3:

La composición mayoritaria de diferentes lotes de material obtenido según el ejemplo 2 (sobrenadantes liofilizados y reconstituidos en H₂O), comparada con la de un suero fetal Bovino, se muestra en las Tablas siguientes:

	Suero Fetal Bovino	Sobrenadante de fracción I
LOTE	n=3 (x±DT)	n= (1-4) *
Proteína total (BIORAD) (mg/ml)	32,13 ± 2,07	38,39
Electroforesis (Albúmina %)	46,86 ± 1,22	62,35
Electroforesis (Alfaglobulina 1 %)	44,93 ± 1,49	3,41
Electroforesis (Alfaglobulina 2 %)		10,24
Electroforesis (Betaglobulina %)	6,13 ± 0,32	11,33
Electroforesis (Gammaglobulinas %)	1,02 ± 0,16	12,37
Electroforesis (restos %)	0 - 0,26	0,31

Albúmina (g/l)	ND	27,500
α-ANTITRIPSINA (g/l)	ND	1,270 ± 0,09
Alfa-1-glicoproteína ácida (g/l)	ND	0,760 ± 0,05
Apo-AI (g/L)	ND	0,804 ± 0,07
Haptoglobina (g/l)	ND	1,173
α2-Macroglobulina (g/l)	ND	1,529 ± 0,16
ATIII (g/l)	ND	0,228 ± 0,02
Apo-AII (g/L)	ND	0,233 ± 0,01
Ceruloplasmina (g/l)	ND	0,269 ± 0,03
Transferrina (g/l)	ND	1,883
Hemopexina (g/l)	ND	0,662 ± 0,03
Plasminógeno (g/l)	ND	0,092
Apo-B (g/L)	ND	0,570 ± 0,03
Fibrinógeno (g/l)	ND	0,285
IgG (g/l)	ND	6,370
IgA (g/l)	ND	1,807
IgM (g/l)	ND	1,125 ± 0,37
Osmolalidad (mOsm/kg)	302,00 ± 12,29	632,5
Turbidez (NTU)	21,52 ± 2,20	2753
pH (1%)	7,39 ± 0,03	9,44

Bicarbonato (mmol/L)	13,00 ± 1,73	18 ± 9
Cloruros (mmol/l)	106,00 ± 1,00	182
Potasio (mmol/l)	10,67 ± 0,58	6
Sodio (mmol/l)	137,33 ± 3,21	252
Calcio (mg/L)	139,90 ± 8,03	65,70 ± 0,87
Fósforo (mg/dL)	9,37 ± 1,08	2,97 ± 0,06
Zinc (µg/L)	3162,67 ± 523,64	1318
Plomo (µg/L)	<5	<5

* = 3 de los lotes se analizan antes de su liofilización.

ND = No Determinado

	Suero Fetal Bovino	Sobrenadante de fracción I
LOTE	n=3 (x±DT)	n=(1-4) * (x±DT)
Distribución molecular (%)		
Polímeros y agregados	7,26 - 16,83	9,57
Formas intermedias	9,84 ± 3,08	31,30
Monómero	78,34 ± 1,83	59,12
PM < Monomero	0 - 0,17	0,00

GLUCOSA (mg/dL)	46 -77	82,67 ± 2,08
UREA (mg/dL)	34,67 ± 1,53	23,75 ± 0,50
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	1,83 ± 0,15	4,30 ± 0,08
BUN-NITRÓGENO UREICO (mg/dL)	16,29 ± 0,72	11,16 ± 0,23
CREATININA (mg/dL)	2,95 ± 0,40	0,84 ± 0,08
BUN/Creatinina Ratio	5,62 ± 1,02	13,16 ± 1,12
BILIRRUBINA TOTAL (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,31 ± 0,03

Fosfatasa alcalina (U/g proteína)	0,03 - 1,14	1,06 ± 0,19
Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) (U/L)	9,67 ± 0,58	16
Serum Glutamyl oxalacetate transaminase (SGOT) (U/L)	24,00 ± 3,46	8
Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L)	433,67 ± 38,18	<50

INSULINA BASAL (µU/mL)	76,97 ± 12,45	12,23 ± 1,78
17 - BETA ESTRADIOL (pg/mL)	30,77 ± 7,45	46,78 ± 5,07
PROGESTERONA (ng/mL)	<0,20 - 0,20	0,80 ± 0,13
TESTOSTERONA TOTAL (ng/mL)	0,14 ± 0,02	2,52 ± 0,14
TESTOSTERONA LIBRE (pg/mL)	<0,03 - 0,17	3,98
TIROXINA (T4) TOTAL (µg/dL)	13,07 ± 0,47	6,51 ± 0,38
T4 LIBRE (ng/dL)	3,00 - >6	1,17 ± 0,10

TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	59 ± 6,56	117,25 ± 8,54
COLESTEROL (mg/dL)	34 ± 4,36	137,50 ± 4,12
HDL-COLESTEROL (mg/dL)	9,67 ± 1,53	6 - 14
LDL-COLESTEROL (mg/dL)	10 - 17	105,25 ± 2,22
VLDL-COLESTEROL (mg/dL)	11,67 ± 1,53	23,50 ± 1,73
ÁCIDOS GRASOS LIBRES (mEq/L)	<0,10	0,30 ± 0,1
FOSFOLÍPIDOS TOTALES (mg/dL)	44,33 ± 4,04	152,50 ± 38,39
* = 3 LOTES SE ANALIZAN ANTES DE SU LIOFILIZACIÓN.		

	Suero Fetal Bovino	Sobrenadante de fracción I
LOTE	n=3 (x±DT)	n= (1-4) * (x±DT)
ÁCIDOS GRASOS SATURADOS (%)		
Tetradecanoico (Mirístico, C14:0)	0,30 - 0,90	0,10 - 0,90
Hexadecanoico (Palmítico C16:0)	25,80 ± 0,66	28,40 ± 3,67
Octadecanoico (esteárico C18:0)	21,03 ± 2,40	9,40 ± 2,09
Eicosanoico (Araquídico C20:0)	0,20 - 0,40	0,20
Docosanoico (Behénico C22:0)	0,23 ± 0,06	≤0,10
ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS (%)		
Hexadecenoico (Palmitoleico C16:1)	1,10 - 2,10	1,83 ± 0,36
Cis-9-octadecenoico (Oleico C18:1)	19,43 ± 3,48	11,90 - 27,10

	Suero Fetal Bovino	Sobrenadante de fracción I
LOTE	n=3 (x±DT)	n= (1-4) * (x±DT)
Cis-11-octadecenoico (Cis-Vaccenico C18:1)	0,20 - 6,60	<0,10 - 1,20
11-eicosenoico (Gondoico C20:1)	0,23 ± 0,06	≤0,10
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (ω3 ω6) (%)		
Cis, cis, cis-9,12,15-octadecatrienoico (alfa-Linolenico C18:3)	0,23 ± 0,06	0,20 - 0,50
Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA C20:5)	0,30 - 1,20	<0,10 - 0,50
Cis-4,7,10,13,16,19-decosahexaenoico (DHA C22:6)	3,93 ± 0,93	0,40 - 1,2
Cis, cis-9,12-octadecadienoico (Linoleico C18:2)	2,63 ± 0,29	27,23 ± 4,15
Cis, cis, cis-6,9,12-octadecatrienoico (gamma-Linolénico C18:3)	0,23 ±0,06	<0,10 - 0,40
Cis-11, 14-eicosadienoico (C20:2)	0,23 ±0,06	≤0,10
Dihomo-gamma-Linolénico (C20:3)	2,27 ± 0,31	0,30 - 1,60
Cis, cis, cis, cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico (Araquidónico C20:4)	4,60 - 7,80	7,00 ± 0,80
All-cis-7,10, 13, 16, 19-Docosapentaenoico (C22:5)	3,83 ± 0,68	0,55 ± 0,07
* = 3 LOTES SE ANALIZAN ANTES DE SU LIOFILIZACIÓN.		

Ejemplo 4:

Ensayo de proliferación celular de la línea CHO con medio suplementado con sobrenadante de fracción I.

5

La línea celular CHO corresponde a células de ovario de hámster chino, estas células presentan morfología epitelial y crecen en modo adherente. El cultivo utilizado proviene de "European Collection of Cell Cultures" ECACC con nº de catálogo 85050302.

10 Se reconstituye el sobrenadante de fracción I con medio de cultivo F12 de Ham's como se ha indicado anteriormente.

Se preparan diferentes concentraciones (volumen/volumen) de Fracción I en medio de cultivo (20%; 40%; 60%; 80% y 100%) así como medio suplementado con un 20% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y medio sin suplementar.

15

Se siembra en una placa de 96 pocillos 50 µl por pocillo de una suspensión de células CHO a una concentración entre 5×10^5 y 1×10^6 células/ml en medio de cultivo sin suplementar.

20 Se añade a cada columna de la placa 50 µl por pocillo del medio que deseamos testar de forma que la dilución final proporcionará medio sin suplementar, suplementado con un 10% FBS y suplementado con un 10; un 20; un 30; un 40 y un 50 % de sobrenadante de fracción I.

La placa de 96 pocillos se incuba a 37 °C; en una atmósfera con un 8% CO₂ y alta humedad relativa (incubador para cultivos celulares) durante 48 horas.

25

Se añaden 100 µl de medio sin suplementar a una columna para tener un blanco de la técnica.

Tras 48 horas de incubación se añade a cada pocillo 10 µl del reactivo WST-1/ECS del equipo comercial "Cell proliferation assay kit" de Millipore con nº de catálogo 2210.

30

Tras una incubación de 2 a 4 horas en condiciones de cultivo habituales para la línea (37°C; 8% CO₂) se agita una placa durante un minuto y se mide la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 420-480 nm, siendo la lectura de longitud de onda de referencia superior a 600 nm (generalmente las placas se leen en un lector SUNRISE de Tecan a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620 nm utilizando para el control del equipo, la lectura y análisis de datos el software Magellan V 6.3).

35

Los valores de absorbancia superiores al blanco más dos veces la desviación estándar de éste se consideran positivos para la técnica.

En el próximo paso se resta el valor promedio del blanco al resto de pocillos de la placa.

5 Se calculan los valores promedio de los pocillos de cada columna (una vez restado el blanco de la técnica) correspondiendo el valor promedio de cada columna el valor promedio para el medio sin suplementar y el medio suplementado con FBS o diferentes concentraciones de sobrenadante de fracción I respectivamente.

10 Se considera que las células en medio sin suplementar prácticamente no proliferan (0%) por lo que el valor de absorbancia promedio en esta columna se resta a todos los valores promedios de todas las columnas.

15 El valor de absorbancia del medio de referencia (medio F12 de Ham suplementado con un 10% de FBS) se considera el valor 100% de proliferación por lo que se dividen todos los valores promedio del punto anterior (una vez se les ha restado el valor del medio sin suplementar) por este valor para obtener el porcentaje de proliferación respecto al medio de referencia.

20 Con los medios suplementados entre un 20 y un 50% de sobrenadante de fracción I como norma general se obtienen porcentajes de proliferación similares al medio de referencia (medio con 10% de Suero Fetal Bovino) o muy superiores (medio con 50% de sobrenadante de fracción I).

A continuación se muestran los resultados de proliferación en porcentaje.

Proliferación celular (%) CHO en medio Ham's F12 suplementado con FBS o S/Fr I

25

S/S	10% FBS (2,5 mg (mg/ml alb)	10% S/Fr.I (6 mg/ml alb)	20% S/Fr.I (12 mg/ml alb)	30% S/Fr.I (17 mg/ml alb)	40% S/Fr.I (23 mg/ml alb)	50% S/Fr.I (29 mg/ml alb)
0	100	70	120	168	206	233

S/S sin suplemento; FBS: suero fetal bovino; alb: albúmina

30

REIVINDICACIONES

1. Medio para el cultivo de células de mamíferos **caracterizado porque**, además de los nutrientes habituales de los medios de cultivos basales para cultivo de células de mamíferos, comprende el sobrenadante de la fracción I del método de Cohn.
5
2. Medio de cultivo, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el sobrenadante de la fracción de Cohn se obtiene a partir de mezclas ("pooles") de, como mínimo, 1000 donantes humanos.
3. Medio de cultivo, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el sobrenadante de la fracción I de Cohn se encuentra en forma desecada.
10
4. Medio de cultivo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el sobrenadante de la fracción I de Cohn se encuentra en forma congelada.
15
5. Procedimiento de preparación de un medio de cultivo de células de mamíferos, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la preparación del sobrenadante de la fracción I del fraccionamiento del plasma humano según el método de Cohn comprende las etapas de
20
 - precipitación con etanol
 - separación del sobrenadante
 - congelación o desecación
 - y opcionalmente las etapas de
 - dilución y/o
- 25
 - diálisis o diafiltración y/o
 - eliminación de agentes patógenos;
- y la posterior adición del sobrenadante de la fracción I preparado de esta manera al medio de cultivo basal.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el sobrenadante de la fracción I desecado se reconstituye en el medio de cultivo basal, en agua destilada o desionizada y apirógena, o en soluciones salinas o tampones habituales de cultivo celular.
30
7. Procedimiento, según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el sobrenadante de la fracción I desecado se reconstituye en el medio de cultivo basal.
35
8. Procedimiento, según las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado porque** el plasma humano es obtenido a partir de mezclas ("pooles") de, como mínimo, 1000 donantes humanos.