



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1003783-7 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2010
(43) Data da Publicação: 20/03/2012
(RPI 2150)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/071

(54) Título: MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS QUE COMPREENDE SOBRENADANTE DE ESTÁGIOS DE FRACIONAMENTO DE COHN, SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2009 ES 200930526

(73) Titular(es): Grifols, S.A.

(72) Inventor(es): José Maria Diez Cervantes, Juan Ignacio Jorquera Nieto, Montserrat Costa Rierola

(57) Resumo: MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS QUE COMPREENDE SOBRENADANTE DE ESTÁGIOS DE FRACIONAMENTO DE COHN, SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO. A presente invenção refere-se aos meios de cultura de células de mamífero que compreendem sobrenadante de algumas das frações do fracionamento de plasma humano de acordo com o método de Gohn, mais especificamente, o sobrenadante das frações I e II + III. Quando o dito sobrenadante é adicionado como um suplemento do meio de cultura, fornece vários nutrientes e fatores para a manutenção e/ou a proliferação efetiva de culturas de células de mamíferos. Além disso, a presente invenção refere-se ao processo de preparação e utilização do referido meio de cultura de células de mamíferos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS QUE COMPREENDE SOBRENADANTE DE ESTÁGIOS DE FRACIONAMENTO DE COHN, SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO"**.

5

Descrição

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um suplemento para utilização em meios de cultura de células de mamíferos. O dito suplemento é obtido a partir do plasma humano desfibrinado (substancialmente livre de fibrinogênio e fibrina) e, quando ele é adicionado como um suplemento ao meio de cultura provê os diferentes nutrientes e fatores para a manutenção satisfatória e/ou proliferação de células em cultura.

10

Antecedentes

As culturas de células são usadas na indústria de biotecnologia, principalmente para produzir proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais. Recentemente, no entanto, a tecnologia foi desenvolvida para tipos diferentes de cultura de células essenciais para uso em terapia celular, em combinação ou não com a terapia de gene.

15

Para com sucesso manter e fazer a cultura das diferentes linhagens de células, um meio é necessário que imite as condições do meio interno em que essas células são encontradas *in vivo*. Geralmente, o meio de cultura consiste em um meio basal que prove o pH, os nutrientes e sais e ao qual uma série de suplementos podem ser adicionados para garantir a proliferação celular. Um dos suplementos mais amplamente usado é o soro de sangue animal. Como um resultado da origem animal do soro, pode haver sérias restrições para sua utilização na obtenção de produtos para uso em seres humanos, porque os resíduos de origem animal são reconhecidos como antígenos estranhos e podem causar reações adversas nos receptores. Além disso, o soro animal tem o inconveniente da falta de uma composição definida, pois há uma grande variabilidade entre as fabricações, porque diferentes raças de animais são usadas. Além disso, devido ao método pelo qual são obtidos, existe grande variabilidade entre os lotes, o que significa

20

25

30

que grandes variações podem ocorrer na capacidade de crescimento e na produção de uma cultura em particular.

A principal dificuldade na criação de linhagens de células é a obtenção de meios nutritivos apropriados que são capazes de substituir o meio natural, tais como extratos de embrião, hidrolisados de proteína ou soros. Um primeiro grupo de meios, como o meio basal de Eagle (MEM) (Eagle, H. (1955) "The specific aminoacid requirements of mammalian cells (strain L) in tissue culture". J. Biol. Chem. 214: 839) e os mais complexos meios 199 de Morgan et al. (Morgan, J.G., Morton, J.H. e Parker, RC (1950), "Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium" Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73: 1) foram meios definidos mas eles exigem um suplemento de soro de entre 5% e 20%.

Para eliminar a contribuição de meios complexos indefinidos, meios mais complexos têm sido formulados, como NCTC 109 (Evans, VJ, Bryant, JC, Fioramonti, MC, McQuilkin, WT, Sanford, KK, e Earle, WR (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, VJ e Briant, JC (1965), "Advances in tissue culture at the National Cancer Institute in the United States of America" em "Tissue culture", editada por C.V. Ramakrishnan, W. Junk, The Hague, pp. 145 167), Ham F10 e 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. E.U.A. 53: 288), série MCDB (Ham, R.G. e McKeehan, W.L. (1978) "Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells" in vitro 14: 11 22) e o meio suplementado por hormônio de Sato (Barnes, D. e Sato, G . (1980) "Methods for growth of cultured cells in serum-free medium" Anal. Biochem. 102: 255-270).

A abordagem recomendada a fim de estabelecer um meio definido é começar com um meio rico, por exemplo Ham F12, suplementado com uma alta concentração de soro (20%) e suplementos de teste para a

redução da quantidade de soro até que ele possa ser reduzido ou eliminado.

Depois de anos de investigação sobre a composição dos meios, eles ainda são selecionados empiricamente.

Os principais meios utilizados e suas aplicações são:

5 - Meio Basal Eagle (EBM). Este é um meio básico, com apenas aminoácidos essenciais. Ele sempre requer suplementação com soro bovino fetal a 10%. Ele é usado para o cultivo de fibroblastos de rato e células He-La.

10 - Meio mínimo essencial de Eagle (MEM). Este é um meio mais comumente usado, que contém mais aminoácidos em uma concentração maior que EBM. Ele é usado para quase qualquer tipo de cultura e requer a adição de soro (10%).

15 - R.P.M.I. 1640. Este é um meio projetado para o crescimento de linfoblastos e linhagens de células de leucemia em suspensão. Com os suplementos adequados, tem uma ampla gama de aplicações.

 - Meio Eagle modificado Dulbecco (DMEM). Ele contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas como EBM. Ele é usado para selecionar hibridomas suplementados com HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) ou HT (hipoxantina-timidina).

20 - DMEM modificado Iscove (IMDM). Este é um meio muito completo, com uma formulação que inclui a albumina bovina, transferrina e selenita, entre outros elementos. É muito útil na cultura de linfócitos em meio isento de soro. É também usado para outros tipos de células, mas, neste caso, requer baixas concentrações de soro.

25 - Meio McCoy 5a. Projetado para o cultivo de linhagens de células diploides de ambos, ratos e seres humanos.

 - Meio Leibovitz L-15. Usado para a cultura de vírus.

30 - Meio Ham F-10. É usado para o cultivo de linhagens de células humanas e deve ser suplementado com proteínas e hormônios. Ele contém metais como Fe, Cu e Zn. É usado para cultura de células amnióticas.

 - Meio Ham F-12. É usado para o crescimento de linhagens de células com suplementos de proteína. Combinado com IMDM ele pode ser

usado como um meio isento de soro.

- Meio 199. É utilizado amplamente para a cultura de células indiferenciadas e para estudar distúrbios de cromossomas.

Todos os meios de cultura consistem nos seguintes elementos:

- 5 1. Soluções salinas balanceadas (BSS).
2. Aminoácidos.
3. Vitaminas.
4. Outros suplementos orgânicos de baixo peso molecular (nucleosídeos, intermediários do ciclo de Krebs, piruvato, lipídios).
- 10 5. Hormônios e fatores de crescimento (soro).
6. Inibidores do crescimento de contaminantes (antibióticos e antifúngicos).

Em meios indefinidos, o soro geralmente fornece hormônios e fatores de crescimento. Os tipos de soro usados são o soro de bezerro (CF),

15 soro bovino fetal (SFB), soro de cavalo (HS) e soro humano (HUS). O mais usado é o soro de bezerro, enquanto o soro fetal de bezerro é usado em linhagens mais exigentes e o soro humano é usado em linhagens de seres humanos.

O uso do soro é problemático, apesar de a composição do soro

20 ser conhecida em parte, há um grande número de componentes presentes em quantidades variáveis que podem influenciar significativamente a cultura. Além disso, o soro varia de lote para lote, devido à variabilidade da técnica para a obtenção de sangue, o método de obtenção do soro (coagulação de sangue) e as condições para separar o soro, como também a diferença entre

25 as diversas fontes de soro. Além do mais, cada mudança de lote de soro requer uma série de verificações tediosas e caras. Além disso, se os produtos do meio de cultura têm que ser purificados, a presença de componentes variáveis no soro torna estes processos significativamente mais difíceis.

Alguns fatores de soro, como o fator de crescimento derivado de

30 plaquetas (PDGF), estimulam a proliferação de fibroblastos, que podem ser um problema no estabelecimento de culturas primárias especializadas, especialmente se houver uma grande variação no seu conteúdo.

Em geral, a inclusão de soro nos meios de cultura é uma desvantagem significativa para padronizar protocolos experimentais e produção de células. Grandes esforços as dessa maneira estão sendo feitos, para estabelecer meios com uma composição definida para o crescimento das células. Como também a reprodutividade procurada, o que permite meios seletivos serem estabelecidos em que o tipo de célula requerido pode crescer. A desvantagem destes meios é que em muitos casos, o crescimento das células é menor e as linhagens de células permanecem viáveis por menos gerações.

Várias tentativas tem sido feitas para produzir suplementos para meios de cultura de células que evitam os problemas causados pelos soros usados no presente. Entre estes, várias frações do plasma humano foram testadas e existem contradições significativas na técnica anterior quanto à utilidade das diferentes frações do plasma de ser humano.

Em geral, as diferentes frações do plasma de ser humano provenientes de fracionamento do plasma usando o método de Cohn foram testadas (Cohn E.J. et al, J Am Chem Soc, 1946) e variações dos mesmos (Kistler e Friedli, Nischmann, em Curling, JM ed, Methods of plasma fractionation, Academic Press 1980), todos estes testes sendo dirigidos para o uso dos diferentes precipitados obtidos no fracionamento, particularmente o II + III, III, IV (IV₁ ou IV₄) e frações V, ou seus equivalentes em diferentes variantes do método de fracionamento.

O objetivo inicial em separar as frações acima mencionadas (precipitado) é para obter um precipitado enriquecido com uma proteína particular como ponto de partida para a purificação da dita proteína, por exemplo γ -globulinas e α e β -globulinas no caso da II + III ou frações III; α -globulinas e transferrina na fração IV e albumina na fração V. Essas frações, dessa maneira, usualmente têm um único tipo de proteína, as outras proteínas estando presentes como impurezas, usualmente em quantidades muito menores. O uso destas frações em culturas de células envolve a adição ao meio de cultura de um tipo de proteína principal, e uma variedade de proteínas que as acompanham como impurezas, entre as quais devem estar

presentes aquelas requeridas pelas células no meio de cultura se o uso do dito material é para ser bem sucedido. Até agora isso tem sido uma forma óbvia, mas ineficiente de suplementar o meio de cultura das células. Esta é certamente a causa da disparidade dos resultados obtidos, como pequenas variações no método de fracionamento que não afetarão significativamente a recuperação da proteína principal, mas podem introduzir grande variabilidade na recuperação das várias proteínas que a acompanham. Por exemplo, a fração II + III, usando o método de Cohn, é obtida em uma concentração de etanol entre 20% e 25% a 5° C e um pH de 6,9. Usando o método Nitschmann, começando com material equivalente, é precipitado em uma concentração de etanol de 19% a -5°C e um pH de 5,8. Com esta variação do pH, frações são obtidas com diferentes características, particularmente o teor de γ -globulinas e outras proteínas que a acompanham.

Além disso, o uso de sobrenadantes, em comparação com o uso de frações precipitadas, tem vantagens adicionais, incluindo aquelas de manter uma alta concentração de albumina no meio e, acima de tudo, evitando a perda de componentes, (por exemplo, hormônios, citocinas, lipídios, etc.) que são importantes para o crescimento das células e que podem não estar presentes nos precipitados ou podem perder a sua funcionalidade (ser inativados), na presença de concentrações de álcool superiores a 20%, como aqueles utilizados para precipitar a fração II + III em determinadas condições (25%) ou o IV₁ + IV₄ e frações V (etanol a 40%).

O documento EP0143648 (Macleod) descreve o uso das frações II + III, III, IV₁ e IV₄ como suplementos para os meios de cultura, em vez de soro animal. Ele também afirma que nem a fração II, nem a fração V são úteis para esta aplicação. Em todos os casos, este documento refere-se exclusivamente às frações precipitadas no fracionamento de Cohn ou suas variantes. Além disso, o documento descreve um método para obter o material adequado para suplementar meios de cultura a partir das frações acima mencionadas. Este método consiste, basicamente, em suspender o precipitado em água e homogeneizando o dito precipitado. Em seguida, o pH é ajustado para alcançar melhor dissolução de proteínas e produzir as condi-

ções fisiológicas para o crescimento das células. Além disso, este método também considera a eliminação de γ -globulina presente por precipitação com polietileno glicol e a separação de material de baixo peso molecular por cromatografia de exclusão molecular. A eficácia do material preparado desta forma é, portanto, muito dependente do método de preparação específico.

Outro documento por Macleod (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 37; 1988) indica que as frações II, III e IV têm pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento da célula, possivelmente devido à presença de inibidores de crescimento, e concentra a atenção na fração IV₄ como o material ideal para suplementar meios de cultura.

O documento EP 0 440 509 (Macleod) descreve um suplemento para meios de cultura de células com base na fração de Cohn IV ou fração II + III, e o processo para sua obtenção. Usando o processo descrito, um produto é obtido, que é substancialmente livre de imunoglobulinas, é de vírus inativo e estável. A imunoglobulina é separada por precipitação com polietileno glicol e os vírus são inativados por pasteurização, na presença de sorbitol como um estabilizador. Esse processo é particularmente aplicável à fração IV (IV₁ ou IV₄).

O documento EP 0264748 (Antoniades) descreve o sobrenadante da fração V de Cohn como um suplemento para meios de cultura de células em vez de soro animal. De acordo com este documento, a vantagem deste material é que não há nenhum custo e ele pode ser aquecido a 60°C por 20 horas.

O sobrenadante da fração V é o material de resíduos finais do fracionamento de Cohn e, dessa maneira, seu uso claramente não tem custo econômico para prejudicar os benefícios do dito fracionamento. Este material tem um alto teor de etanol (40%), que é altamente tóxico e que este documento não indica que precisa ser eliminado. Além disso, para o tratamento descrito a 60°C, a proteína presente teria que ser estabilizada, mas esse detalhe também é omitido no documento, tornando difícil a invenção produzir conforme descrito. Nem deverá o efeito de desnaturação do etanol em uma concentração tão alta como no presente caso ser subestimada.

WO 94/18310 (Mankarious) descreve um método para produzir um suplemento para meios de cultura de células a partir da fração IV₄ de Cohn. Este método leva em conta a suspensão e subsequente clarificação da fração IV₄ e também a inativação ou eliminação dos vírus por pasteurização e/ou filtração.

A Patente GB 2 166 756 A descreve um método para a cultura de células do baço para a produção de interferona. Este método é baseado em um meio de cultura RPMI, que é suplementado por uma fração de soro obtida a partir de soro ou plasma dos quais o fibrinogênio foi eliminado e que é caracterizado por pré-albumina e gamaglobulinas que foram removidas (pág. 1, linhagens 30 - 34). Em uma modalidade preferida, esta fração é purificada por precipitação com álcool entre 10% e 20%, em um pH de 5,85 (pág. 1, linhagens 37 - 38). Em uma modalidade particular (obtendo a fração EPF), o sobrenadante usado como um meio de cultura é obtido em uma concentração de etanol de 19% e um pH de 5,85 (página 2, linhagens 44 - 45). O sobrenadante obtido é dialisado, a fim de eliminar o etanol, e posteriormente liofilizado para preservá-lo. Opcionalmente, ela é liofilizada sem diálise anterior, e, conseqüentemente, o etanol também é eliminado. De acordo com os inventores, usando um meio de cultura (RPMI), suplementado com a dita fração, é obtida excelente produção de interferona. Na precipitação de álcool do plasma, as condições de processo (concentração de etanol, pH, força iônica do meio, temperatura e concentração de proteína), devem ser cuidadosamente reguladas para manter as proteínas particulares em solução e insolubilizar outras de modo que elas sejam precipitadas e possam, dessa maneira, ser separadas. Variações em uma ou mais das ditas condições irão produzir diferenças significativas no produto obtido, a concentração de etanol e pH sendo os fatores determinantes da composição do precipitado e do sobrenadante obtidos.

Outras tentativas foram feitas para suplementar os meios de cultura de células usando soro ou frações de soro de origem humana, em vez de soro fetal bovino, como demonstrado nos documentos WO 2004/055174, EP 1820852 ou CA 1177424. O soro obtido a partir do sangue total ou de

plasma não pode ser comparado com um especificamente definido e fração de plasma caracterizada, e tem o inconveniente da falta de reprodutibilidade entre os lotes. Além disso, nenhum destes documentos foi bem sucedido em definir e caracterizar a composição exata do material usado. Portanto, a maioria dos problemas associados com o uso de soro de origem animal continua a surgir.

Kwok et al. descrevem o uso de plasma de mulheres grávidas, em vez de soro fetal bovino para a cultura de tipos de células específicas, atribuindo o seu efeito à presença de fatores desconhecidos. Ele também postula um efeito sinérgico de albumina humana neste tipo de cultura. É claro para uma pessoa versada na técnica que, usando plasma de mulheres grávidas, é solicitada a presença de fatores de crescimento celular comparáveis aos de soro fetal, mas a homogeneidade desse material não é comparável às misturas de plasma de milhares de doadores, como descrito abaixo.

Como descrito aqui acima, várias tentativas foram feitas para substituir o soro animal como um suplemento de meio de cultura de células. Algumas dessas tentativas foram feitas a partir de frações do plasma de ser humano, particularmente frações utilizando o método de Cohn. Apesar de que, no presente, o soro de animais continua a ser amplamente utilizado como um suplemento para meios de cultura de células de mamíferos e as tentativas para substituí-lo com um derivado do plasma de ser humano falharam.

De todo o exposto acima, pode-se deduzir que, na técnica anterior nenhum material de origem humana está disponível que pode ser usado para suplementar meios de cultura de células e que também é seguro no que se refere à transmissão de agentes patogênicos, pode ser obtido em uma escala industrial a um custo aceitável e lucro, tem uniformidade adequada entre os lotes e é de qualidade de grau farmacêutico.

Descrição da invenção

Os inventores realizaram pesquisas visando a substituição de soro de origem animal como um suplemento para meios de cultura com frações do plasma de ser humano e descobriram, surpreendentemente, que a

partir de um sobrenadante do fracionamento de Cohn, especificamente sobrenadante da fração II + III ou o sobrenadante da fração I, é possível suplementar meios de cultura de células e obter excelentes resultados no que se refere ao crescimento celular. A utilização deste material resolve os problemas acima mencionados, pois é de origem humana, é obtido industrialmente usando boas práticas de fabricação (GMPs), com custos aceitáveis e lucros, mostra uniformidade e reprodutibilidade adequadas entre os lotes e é de qualidade de grau farmacêutico. Além do mais, o material pode ser tratado através de métodos que evitem a transmissão de patógenos.

10 O processo para a preparação desses derivados está descrito abaixo.

Primeiro, o plasma humano de doadores saudáveis é obtido no qual uma solução anticoagulante é adicionada contendo, em uma utilização preferencial da invenção, somente citrato de sódio, em quantidade suficiente para garantir que o plasma não coagule. A adição de substâncias (por exemplo, os carboidratos como a glicose) para melhorar a preservação das células de sangue não é essencial, porque o plasma usado na invenção é substancialmente livre de células, como tem sido possível obtê-lo por plasmaferase, na presença de anticoagulante, em vez de doação de sangue completo.

20 As quantidades de anticoagulante e outros padrões que o processo de obtenção, armazenamento e manipulação do plasma de ser humano deve satisfazer estão descritas em normas internacionais publicamente disponíveis que afetam a indústria de fracionamento de plasma de ser humano, como, por exemplo, o Código de Regulamentação Federal dos Estados Unidos da América (United States of America's Code of Federal Regulations), as diretrizes e normas da Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (United States' Food and Drug Administration - FDA) e da Agência Europeia para Avaliação de Medicamentos (European Medicines Evaluation Agency - EMEA), bem como as diretrizes e normas da Conferência Internacional de Harmonização (International Conference of Harmonization - ICH) e farmacopeias internacionais, como as farmacopeias europeia,

japonesa ou dos Estados Unidos, e também as normas conhecidas como as Boas Práticas de Fabricação atuais (cGMP). No restante deste documento, todas estas normas serão referidas como "o conjunto de normas que afetam o fracionamento do plasma de ser humano para fins farmacêuticos". Este conjunto de normas também se aplica aos estágios da invenção que estão descritas abaixo.

Uma vez que o plasma de ser humano foi obtido, ele é congelado, armazenado e transportado de acordo com o conjunto de normas que afetam o fracionamento do plasma de ser humano para fins farmacêuticos, e em um uso preferencial da invenção, especificamente de acordo com as exigências da Monografia da Farmacopeia Europeia 0853. Cada unidade de plasma (doação) é analisada para descartar a presença de marcadores de infecção viral nos doadores, que tenham sido previamente submetidos a questionários e exames físicos, de acordo com as normas acima mencionadas. Em uma aplicação preferida da invenção, o plasma de um possível doador não é usado até que o doador tenha se submetido ao processo de avaliação por duas vezes em menos de seis meses, tempo em que o doador se torna um "doador qualificado".

Em uma aplicação preferida da invenção, amostras obtidas em cada doação são analisadas para descartar a presença de marcadores para infecções tais como, por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite B e C (HBV e HCV) e outros vírus patogênicos ao homem. Parte da invenção é o armazenamento controlado de doações de plasma por um período não inferior a 60 dias, de preferência não inferior a 90 dias, o que permitiria doações anteriores ser revogadas se um doador previamente saudável mostra sinais de infecção por agentes patogênicos ou de outros fatores de risco para a saúde após a doação. Em uma aplicação preferida da invenção, as análises das amostras de cada doação são repetidas uma ou mais vezes depois de preparar misturas piloto ("minipools" ou "pools" piloto) de um número variável de doações que podem flutuar, por exemplo, entre 10 e 10.000, de preferência entre 90 e 2000, mais preferivelmente entre 100 e 1000. Métodos de amplificação do material genético

dos vírus podem ser usados para essas repetidas análises, como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou outros métodos genericamente incluídos entre aqueles conhecidos para o teste de ácido nucléico (NAT).

5 Uma vez que todas as análises e o período de armazenamento controlado (inventário mantido) estão completos e, depois de descartar unidades consideradas inadequadas pela análise, o plasma pode ser usado em estágios posteriores da invenção.

10 A próxima etapa consiste em descongelar as doações contando não menos que 100 unidades, de preferência acima de 1000 unidades e mais preferivelmente, acima de 4000 unidades. Em uma aplicação preferida da invenção, o descongelamento pode ocorrer a uma temperatura entre 0 ° C e 4 ° C. As doações são misturadas durante o processo de descongelamento para produzir uma mistura de plasma ("pool" de plasma). Opcional-

15 mente, um material precipitado pode ser separado, já que ele é instável devido ao processo de descongelamento. Ele é geralmente descrito como crioprecipitado e é rico em fator de von Willebrand (FVW), fator VIII (FVIII), fibrinogênio (FBN), fibronectina (FNC) e outras proteínas.

20 Em seguida, em uma utilização preferida da invenção, etanol de grau farmacêutico de 96% é adicionado ao plasma até uma concentração de cerca de 8% (volume/volume). Para garantir que as proteínas não são desnaturadas devido ao processo exotérmico da dissolução de etanol no plasma, ele é adicionado em um volume controlado. Simultaneamente, e com o mesmo objetivo, a temperatura do pool de plasma é gradualmente reduzida

25 para cerca de 2 ° C. A presença de etanol garante que o plasma não congelará. Nestas condições, uma fração proteica é precipitada, que é muito rica em fibrinogênio e inclui a maioria das proteínas presentes no crioprecipitado, se o dito crioprecipitado, em uma aplicação da invenção, não tenha sido separado antes da adição do álcool. Esta fração é conhecida genericamente

30 como fração de Cohn I (Fr-I), pois é obtida por um processo que corresponde basicamente ao descrito por Edwin J. Cohn (Cohn E.J. et al; J Am Chem Soc, 1946). Quando o precipitado obtido neste estágio é separado, a fração

sobrenadante é considerada substancialmente livre de fibrinogênio e, portanto, livre de qualquer interferência que o fibrinogênio poderia causar nas culturas de células, sendo apropriado para o objetivo da invenção como um suplemento para meios de cultura de células, uma vez que o álcool adicionado foi eliminado, devido à sua toxicidade celular.

Em uma aplicação preferida da invenção, após ter separado um ou nenhum dos dois precipitados descritos anteriormente (crioprecipitado e Fr-I), etanol de grau farmacêutico 96% é adicionado à mistura existente para uma concentração entre 20% e 25% (volume/volume). Para evitar a desnaturação de proteínas, devido ao processo exotérmico da dissolução de etanol no plasma, a adição é realizada em um volume controlado. Simultaneamente, e com o mesmo objetivo, a temperatura do pool de plasma é gradualmente reduzida para cerca de -5 ° C. A presença de etanol garante que o plasma não congele. Nestas condições, uma fração proteica é precipitada, a qual é muito rica em proteínas descritas anteriormente como presentes no crioprecipitado e na Fr-I (se já não tiver sido separada, conforme descrito anteriormente) e também é muito rica em imunoglobulinas, principalmente IgG e IgM. Esta fração é conhecida genericamente como fração I + II + III (Fr-I + II + III), se a fração Fr-I de Cohn não tenha sido anteriormente separada, ou fração II + III (Fr-II + III) se a Fr-I de Cohn tinha sido previamente separada. Quando o precipitado obtido neste estágio é separado, a fração do sobrenadante é considerada substancialmente livre de fibrinogênio e imunoglobulinas e, portanto, livre de interferências que podem ser causadas por estas proteínas em cultura de células, sendo apropriada para o objetivo da invenção como um suplemento para meios de cultura de células, uma vez que o álcool adicionado foi eliminado por causa de sua toxicidade celular.

Durante os estágios descritos são aplicados controles para o processo de produção de materiais derivados do plasma para garantir que os processos ocorram de acordo com as especificações necessárias relativas à concentração de proteína, pH, contagem de microrganismos, etc.

Estes sobrenadantes são obtidos por um processo que corresponde basicamente ao descrito por Edwin J. Cohn, embora possa haver dife-

renças na composição, devido tanto a mudanças na escala de produção (número de doações e o volume dos *pools* de plasma) e quanto às variações entre o processo de acordo com a invenção e o processo de aplicação naquele momento.

5 Estes sobrenadantes, obtidos diretamente a partir do fracionamento industrial do plasma humano (baseado no método de Cohn), além da eliminação do etanol que eles contêm (cerca de 8% na fração do sobrenadante I e aproximadamente 20% a 25% na fração de sobrenadante II + III), não necessitam de tratamentos de purificação subsequentes. O etanol conti-

10 do nestes sobrenadantes pode ser eliminado por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica anterior. De preferência é executado por diálise ou diafiltração ou diretamente por liofilização, evaporação ou dessecação (por exemplo, secagem com spray), estes métodos sendo fáceis para industrializar.

15 Um método de preparação válido para obter um produto completamente estável consiste em começar com qualquer um dos sobrenadantes descritos e, opcionalmente, diluí-los adequadamente com injeção de água, soro fisiológico ou tampão, em um pH de 7 a 8 e uma temperatura de entre 2 a 8°C. A solução é clarificada através de placas de celulose ou placas de

20 fundo que são inertes em relação à adsorção de proteína e, finalmente, é clarificada para um tamanho de poros de aproximadamente 0,5 micron. O produto então sofre diafiltração, usando membranas de aproximadamente 10 kDa de corte molecular nominal, contra dois ou mais volumes de injeção de água, solução de soro fisiológico ou tampão, em um pH preferido de cerca

25 de 7. Preferivelmente, o número de volumes de troca de diafiltração é de aproximadamente 5.

A solução diafiltrada é clarificada por filtração absoluta, com um filtro gradiente de 0,2 a 0,1 micron de tamanho de poros. Em seguida, o produto pode ser nanofiltrado através de poros de aproximadamente 35 nm e

30 20 nm, de preferência a uma temperatura de 2 a 8°C e uma pressão de transmembrana inferior ou igual a 0,1Mpa (1 bar). A carga aplicada é de preferência cerca de 70 litros/m² da área para o filtro com o menor tamanho de

poro.

O produto obtido pode ser concentrado por ultrafiltração com o mesmo valor de concentração de proteína total que o material de partida (sobrenadante), ou, mais concentrado, se preferido.

5 Em qualquer um dos casos, o material obtido é medido em pequenos frascos ou garrafas de vidro, e armazenado de preferência a -30 °C ou a uma temperatura inferior até que ele seja usado. Em uma etapa prévia à medição do sobrenadante em frascos, uma filtração de esterilização pode ser realizada através de um poro de tamanho entre 0,1 e 0,2 micron.

10 O produto congelado também pode ser liofilizado ou submetido a outros tratamentos para fornecer um produto seco. O produto pode então ser submetido à radiação gama e pode ser mantido no estado seco, de preferência a 2 até 8°C até ser usado.

Se a diafiltração não é realizada sobre o material de partida
15 (S/Fr-I ou S/Fr-II + III ou equivalente) e eliminação do álcool diretamente por liofilização é escolhida, ele é medido em frascos de vidro ou garrafas. Antes de medir o sobrenadante em frascos, um processo de filtração de esterilização pode ser realizado através de um poro de tamanho entre 0,1 e 0,2 micron. O material medido é congelado, de preferência a uma temperatura inferior ou igual a -30°C, e submetido à liofilização e radiação gama usando
20 técnicas conhecidas.

Opcionalmente, o material pode ser tratado com métodos de eliminação/inativação de agentes patogênicos. De preferência o material, congelado ou liofilizado, é irradiado com radiação gama entre 15 e 35 kilogray, sendo que o ideal entre estabilidade da composição e eliminação de
25 vírus foi obtido com 25 kilograys.

O produto liofilizado pode ser armazenado por um longo período de tempo, de preferência, entre 2 a 8°C.

Quanto à proliferação celular, o sobrenadante da Fr-II + III é
30 mantido estável (percentagens de proliferação igual a $(100 \pm 20\%)$ ou superior a FCS) por pelo menos 168 dias na forma liofilizada, mantido em um freezer (2 a 8°C).

Este material, reconstituído em meio de cultura Ham F12 é estável durante pelo menos 113 dias a uma temperatura inferior ou igual a -18°C (percentagens de proliferação celular igual ou maior do que o momento zero).

5 A estabilidade do meio de cultura Ham F12, suplementado com 50% de S/Fr-II + III é de quatro dias em um freezer.

A melhor maneira de preservar o material até que ele seja usado é como um liofilizado em sua embalagem final. Desta forma, ele pode ser medido em doses diretamente e o etanol pode ser eliminado no processo de liofilização real.

Estes sobrenadantes são adicionados ao meio de cultura convencional livre de soro contendo sais inorgânicos, aminoácidos e vitaminas, entre outros componentes necessários para o crescimento da célula, como o meio Ham F12 ou meio Dulbecco modificado (DMEM), por exemplo.

15 O meio resultante pode ser usado para a cultura de uma ampla variedade de células de mamíferos. As técnicas convencionais e as condições de cultura conhecidas por uma pessoa versada na técnica são usadas para esta finalidade.

O sobrenadante liofilizado pode ser reconstituído em meio de cultura basal, por exemplo, meio Ham F12 ou meio essencial mínimo modificado Dulbecco (DMEM), em água destilada ou desionizada e água apirogênica, ou em soluções salinas ou tampões comuns em cultura de células.

O sobrenadante reconstituído em meio de cultura pode ser usado para suplementar o meio de cultura básico, acrescentando entre 2% e 50% (v/v) de sobrenadante reconstituído, por exemplo: 2 ml da fração sobrenadante I ou fração sobrenadante II + III reconstituída em um meio com 98 ml de meio base (2%). Outro exemplo seria adicionar 50 ml da fração sobrenadante I ou fração sobrenadante II + III reconstituída em um meio com 50 ml de meio basal (50%).

30 É recomendável que o sobrenadante reconstituído em água, soluções salinas ou tampões adequados para a cultura de células seja adicionado ao meio de cultura basal a entre 2% e 20% (v/v), por exemplo, 20 ml

de sobrenadante reconstituído em 80 ml de meio (20%). Se as concentrações de 50% (v/v) são obrigatórias, o sobrenadante reconstituído teria de ser adicionado a um meio básico de duplo concentrado (2X), por exemplo, adicionar 50 ml da fração sobrenadante I ou fração sobrenadante II + III em água a 50 ml de meio básico 2X.

O meio de cultura suplementado pode ser utilizado para as técnicas de cultura usuais e este meio suplementado pode ser usado diretamente ou filtrado de antemão através de 0,22 µm.

Material congelado preservado (sobrenadante) deve ser descongelado antes de ser adicionado ao meio de base. Depois de descongelado é recomendável que ele seja adicionado ao meio de cultura de base a entre 2% e 20% (v/v), por exemplo, 20 ml da fração sobrenadante II + III reconstituída em 80 ml de meio (20%). Se concentrações de 50% (v/v) são obrigatórias, quando suplementando o meio a fração I ou fração sobrenadante II + III teria de ser adicionada duplamente concentrada (2X), por exemplo, adicionar 50 ml da fração II + III sobrenadante a 50 ml de meio básico 2X.

O meio de cultura suplementado pode ser utilizado para as técnicas de cultura usuais e o meio suplementado pode ser usado diretamente ou depois de ser filtrado através de 0,22 µm.

Exemplo 1

Preparação do sobrenadante das frações I e II + III.

Doações individuais de plasma produzidos por plasmáférise são misturadas e descongeladas, o descongelamento sendo realizado em um reator a uma temperatura controlada de entre 0°C e 4°C. Ao final das contas, 3783 kg de plasma são obtidos.

Para separar o crioprecipitado, o plasma é centrifugado entre 9000 e 12 mil xg, mantendo a temperatura de centrifugação, entre 0°C e 4°C.

Para separar a fração I, a concentração de proteína do sobrenadante do crioprecipitado (C/S), que deve ser de aproximadamente 5%, é verificado. Se for superior, ele é diluído com água de injeção. O pH também é

ajustado para aproximadamente 7.

Começando com o C/S, o etanol é adicionado a uma concentração de 8% (volume/volume). A velocidade com que o etanol é adicionado deve ser lenta (menor ou igual a 2 kg/min), com agitação moderada para evitar a desnaturação. Durante a adição de etanol a temperatura do sobrenadante é gradualmente reduzida no reator de precipitação até atingir uma temperatura final de -2°C. O pH final deve ser de aproximadamente 7.

Após cerca de duas horas de reação, centrifugação é realizada para separar a fração I. Esta centrifugação ocorre entre 9000 e 12000 xg. O sobrenadante obtido (S/Fr-I) é mantido a uma temperatura entre 0°C e -4°C.

Neste ponto, ou no C/S, o complexo protrombínico podem, opcionalmente, ser extraídos por cromatografia de troca iônica (Curling, JM ed; Methods of plasma fractionation, Academic Press 1980).

Para separar a fração II + III, o pH da S/Fr-I é ajustado para aproximadamente 7 e o etanol então é adicionado para levá-la a aproximadamente 20% (volume/volume). A velocidade com que o etanol é adicionado deve ser lenta (menor ou igual a 2 kg/min) e com agitação moderada para evitar a desnaturação. Durante a adição do etanol, a temperatura do sobrenadante é gradualmente reduzida no reator de precipitação a uma temperatura final de aproximadamente -5°C. O pH final deve ser de cerca de 7.

Neste exemplo, após cerca de seis horas de tempo de reação a fração II + III é separado.

Neste ponto (sobrenadante da fração II + III), ou no C/S, ou no S/Fr-I a antitrombina pode, opcionalmente, ser extraída por cromatografia de afinidade a heparina (Fernandez J. et al. Sangre 41 (supl. 3) 42 (1996).

Exemplo 2

Dose de medição e liofilização

Um sobrenadante da fração II + III obtido de acordo com o exemplo 1 é diluído com água de injeção para um pH de 7 - 8 e uma temperatura entre 2°C e 8°C até que uma concentração de etanol de 8% seja alcançada. A solução é clarificada através de placas de celulose de até 0,5 micron de tamanho dos poros. Em seguida, o produto é submetido, opcionalmente,

a diafiltração para eliminar o etanol, utilizando membranas de polissulfona de 10 kDa de corte nominal molecular, na presença de água de injeção, em um pH de 7. O número de volumes de câmbio durante diafiltração é 5.

5 A solução é clarificada por filtração absoluta com um gradiente de filtro de 0,2 micron até 0,1 micron de tamanho dos poros. Em seguida, o produto é opcionalmente nanofiltrado através de poros de 35 nm e 20 nm, com filtros de celulose de Cupra-amônio a uma temperatura entre 2°C e 8°C e uma pressão transmembrana de menos de 0,1 Mpa (menos de um bar), no máximo, até que os filtros estejam bloqueados.

10 O produto é concentrado por ultra-filtração com o mesmo valor de concentração de proteína total que o material de partida e, após a filtração de esterilização através de poros de 0,2 micron, é medido em frascos de vidro e armazenado a -30°C até ser utilizado.

15 O produto congelado pode ser liofilizado para fornecer um produto seco, que é submetido à radiação gama e pode ser mantido entre 2°C e 8°C até ser utilizado.

Exemplo 3

20 A composição majoritária dos diferentes lotes de material obtida de acordo com o exemplo 2 (sobrenadantes liofilizados reconstituídos em H₂O), comparada com a do soro fetal bovino é mostrada nas tabelas abaixo:

	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I Sobrenadante
LOTE	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n= (1-4) *
Proteína Total (BIORAD) (mg/ml)	32,13 ± 2.07	30,81± 2.29	38.39
Eletroforese (Albumina%)	46,86 ± 1,22	76,27 ± 1,73	62,35
Eletroforese (Alfaglobulina 1%)	44,93 ± 1,49	4,64 ± 0,18	3,41
Eletroforese (Alfaglobulina 2%)		9,28 ± 1,48	10,24
Eletroforese (Betaglobulina%)	6,13 ± 0,32	7,74 ± 0,43	11,33
Eletroforese (Gamaglobuli-	1,02 ± 0,16	1,63 ± 0,30	12,37

	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I Sobrenadante
LOTE	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n= (1-4) *
nas%)			
Eletroforese (rest%)	0 - 0,26	0,08 - 0,63	0,31

Albumina(g/l)	ND	23,8 ± 2,1	27,500
α-ANTITRIPSINA(g/l)	ND	0,915 ± 0,05	1,270 ± 0,09
Alfa-1- ácido glicoproteína (g/l)	ND	0,574 ± 0,06	0,760 ± 0,05
Apo-AI (g/L)	ND	0,354 ± 0,07	0,804 ± 0,07
Haptoglobina(g/l)	ND	0,826 ± 0,05	1,173
α2-macroglobulina (g/l)	ND	0,296 ± 0,04	1,529 ± 0,16
ATIII (g/l)	ND	0,200 ± 0,01	0,228 ± 0,02
Apo-AII (g/L)	ND	0,195 ± 0,02	0,233 ± 0,01
Ceruloplasmina(g/l)	ND	0,147 ± 0,02	0,269 ± 0,03
Transferrina(g/l)	ND	1,615 ± 0,11	1,883
Hemopexina(g/l)	ND	0,442 ± 0,01	0,662 ± 0,03
Plasminogênio (g/l)	ND	<0,0228	0,092
Apo-B (g/L)	ND	<0,0428	0,570 ± 0,03
Fibrinogênio (g/l)	ND	<0,0329	0,285
IgG (g/l)	ND	0,347 ± 0,03	6,370
IgA (g/l)	ND	0,496 ± 0,03	1,807
IgM (g/l)	ND	0,043 - 0,1105	1,125 ± 0,37

Osmolalidade (mOsm/kg)	302,00 ± 12,29	234,67 ± 35,30	632,5
Turvação (NTU)	21,52 ± 2,20	158 - 281	2753
pH (1%)	7,39 ± 0,03	8,42 ± 0,14	9,44

Bicarbonato (mmol/L)	13,00 ± 1,73	2 - 6	18 ± 9
Cloretos (mmol/l)	106,00 ± 1,00	71,80 ± 3,12	182
Potássio (mmol/l)	10,67 ± 0,58	2,87 ± 0,23	6
Sódio (mmol/l)	137,33 ± 3,21	130,33 ± 4,93	252

	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I Sobrenadante
LOTE	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n= (1-4) *
Cálcio (mg/L)	139,90 ± 8,03	53,07 ± 6,45	65,70 ± 0,87
Fósforo (mg/dL)	9,37 ± 1,08	2,17 ± 0,21	2,97 ± 0,06
Zinco (µg/L)	3162,67 ± 523,64	611,50 ± 24,75	1318
Chumbo (µg/L)	<5	<5	<5

* = 3 dos lotes são analisados antes de ser liofilizados.

ND = Não determinado

LOTE	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I sobrenadante
Distribuição Molecular (%)	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n=(1-4) * (x±DT)
Polímeros e agregados	7,26 - 16,83	2,85 - 8,12	9,57
Formas intermediárias	9,84 ± 3,08	10,18 ± 1,48	31,30
Monômeros	78,34 ± 1,83	84,20 ± 0,87	59,12
PM < monômero	0 - 0,17	0 - 1,47	0,00

GLICOSE (mg/dL)	46 - 77	63,33 ± 6,66	82,67 ± 2,08
UREIA (mg/dL)	34,67 ± 1,53	18,33 ± 3,06	23,75 ± 0,50
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	1,83 ± 0,15	3,17 ± 0,35	4,30 ± 0,08
BUN-NITROGÊNIO DE UREIA (mg/dL)	16,29 ± 0,72	8,62 ± 1,44	11,16 ± 0,23
CREATININA (mg/dL)	2,95 ± 0,40	0,52 ± 0,12	0,84 ± 0,08
BUN/taxa de creatinina	5,62 ± 1,02	16,75 ± 1,40	13,16 ± 1,12
BILIRRUBINA TOTAL (mg/dL)	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,31 ± 0,03

Fosfatase alcalina (U/g proteína)	0,03 - 1,14	0,78 ± 0,10	1,06 ± 0,19
Gama-glutamila transpeptidase (GGT) (U/L)	9,67 ± 0,58	14,67 ± 2,08	16

	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I sobrenadante
Transaminase Glutâmica-Oxaloacética de Soro (SGOT) (U/L)	24,00 ± 3,46	9,00 ± 1,73	8
Lactato de hidrogenase (LDH) (U/L)	433,67 ± 38,18	<50	<50

INSULINA BASAL (μU/mL)	76,97 ± 12,45	<2 - 2,53	12,23 ± 1,78
17 - BETA ESTRADIOL (pg/mL)	30,77 ± 7,45	41,13 ± 6,09	46,78 ± 5,07
PROGESTERONA (ng/mL)	<0,20 - 0,20	0,46 - 0,85	0,80 ± 0,13
TESTOSTERONA TOTAL (ng/mL)	0,14 ± 0,02	1,79 ± 0,28	2,52 ± 0,14
TESTOSTERONA LIVRE (pg/mL)	<0,03 - 0,17	3,69 ± 0,49	3,98
TIROXINA TOTAL (T4) (μg/dL)	13,07 ± 0,47	4,12 ± 0,34	6,51 ± 0,38
T4 LIVRE (ng/dL)	3,00 - >6	0,99 ± 0,09	1,17 ± 0,10

TRIGLICERIDEOS (mg/dl)	59 ± 6,56	18,67 ± 0,58	117,25 ± 8,54
COLESTEROL (mg/dL)	34 ± 4,36	31 ± 4,58	137,50 ± 4,12
HDL-COLESTEROL (mg/dL)	9,67 ± 1,53	9,33 ± 2,08	6 - 14
LDL-COLESTEROL (mg/dL)	10 - 17	17,67 ± 3,06	105,25 ± 2,22
VLDL-COLESTEROL (mg/dL)	11,67 ± 1,53	4	23,50 ± 1,73
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (mEq/L)	<0,10	0,19 ± 0,03	0,30 ± 0,1
FOSFOLÍPIDEOS TOTAIS (mg/dL)	44,33 ± 4,04	57 ± 5,00	152,50 ± 38,39

* = 3 OS LOTES SÃO ANALISADOS ANTES DE SEREM LIOFILIZADOS.

LOTE	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I sobrenadante
	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n= (1-4) * (x±DT)
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS (%)			
Tetradecanóico (mirístico. C14:0)	0,30 - 0,90	0,50 - 1,45	0,10 - 0,90
Hexadecanóico (palmitico C16:0)	25,80 ± 0,66	25,67 ± 0,49	28,40 ± 3,67
Octadecanóico (estearico C18:0)	21,03 ± 2,40	11,50 ± 0,28	9,40 ± 2,09
Eicosanóico (araquídico C20:0)	0,20 - 0,40	0,20	0,20
Docosanóico (behenico C22:0)	0,23 ± 0,06	0,10	≤0,10
ÁCIDOS GRAXOS MONOSSATURADOS (%)			
Hexadecenóico (palmitoleico C16:1)	1,10 - 2,10	1,13 ± 0,06	1,83 ± 0,36
Cis-9-octadecenóico (oleic C18:1)	19,43 ± 3,48	16,92 ± 0,26	11,90 - 27,10
Cis-11-octadecenóico (cis-vacênico C18:1)	0,20 - 6,60	1,05 - 2,40	<0,10 - 1,20
11-eicosenóico (gondoico C20:1)	0,23 ± 0,06	0,10	≤0,10
ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS (ω3 ω6) (%)			
Cis, cis, cis-9,12,15-octadecatrienóico (α-linolenico C18:3)	0,23 ± 0,06	0,10 - 0,30	0,20 - 0,50

	Soro bovino fetal	Fração II+III sobrenadante	Fração I sobrenadante
LOTE	n=3 (x±DT)	n=3 (x±DT)	n= (1-4) * (x±DT)
Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA C20:5)	0,30 - 1,20	0,10 - 0,80	<0,10 - 0,50
Cis-4,7,10,13,16,19-decosahexaenóico (DHA C22:6)	3,93 ± 0,93	0,45 - 1,40	0,40 - 1,2
Cis, cis-9,12-octadecadienóico (linoleico C18:2)	2,63 ± 0,29	26,28 ± 0,59	27,23 ± 4,15
Cis, cis, cis-6,9,12-octadecatrienóico (gamma-linolênico C18:3)	0,23 ± 0,06	0,20 - 0,40	<0,10 - 0,40
Cis-11, 14-eicosadienóico (C20:2)	0,23 ± 0,06	0,10	≤0,10
Diomo-gama-linolênico (C20:3)	2,27 ± 0,31	1,70 ± 0,09	0,30 - 1,60
Cis, cis, cis, cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico (araquidônico C20:4)	4,60 - 7,80	8,62 ± 0,62	7,00 ± 0,80
All-cis-7,10, 13, 16, 19-docosapentaenóico (C22:5)	3,83 ± 0,68	0,45 - 0,75	0,55 ± 0,07

* = 3 OS LOTES SÃO ANALISADOS ANTES DE SEREM LIOFILIZADOS.

Exemplo 4

Teste da proliferação de células da linhagem CHO com meio suplementado com o sobrenadante da fração I.

5 A linhagem de células CHO consiste em células de ovário de hamster chinês que têm uma morfologia epitelial e cresce de maneira adesiva. A cultura utilizada vem da Coleção Europeia de Culturas de Células (E-CACC), nº de catálogo 85.050.302.

O sobrenadante da fração I é reconstituído com meio de cultura Ham F12 como mencionado acima.

10 Diferentes concentrações (volume/volume) da fração I são cultivadas em meio de cultura (20% e 40% e 60%, 80% e 100%) e em meio suplementado por 20% (volume/volume) de soro fetal bovino (FCS) e meio não suplementado.

15 Uma placa de 96 cavidades é semeada com 50 µl por cavidade de uma suspensão de células CHO em uma concentração de 5×10^5 e 1×10^6 células/ml em meio de cultura não suplementado.

20 50 µl por cavidade do meio a ser testado são adicionados a cada coluna da placa de modo que a diluição final dará um meio não suplementado, suplementado com 10% de FCS e com 10%, 20%, 30%, 40% e 50% da fração I do sobrenadante.

A placa de 96 cavidades é incubada a 37°C em uma atmosfera com 8% de CO₂ e alta umidade relativa (incubadora de cultura de células) por 48 horas.

25 100 µl de meio não suplementado são adicionados a uma coluna como uma amostra de comparação.

Depois de 48 horas de incubação, 10 µl de reagente WST-1/ECS do kit ensaio de proliferação de células Millipore, disponível comercialmente, nº de catálogo 2210, é adicionado a cada cavidade.

30 Depois de 2 a 4 horas de incubação nas condições de cultura usuais para a linhagem (37°C e 8% de CO₂), a placa é agitada por um minuto e a absorvência é medida em um leitor de microplacas em um comprimento de onda de 420 a 480 nm, o comprimento da onda de leitura de referência

sendo superior a 600 nm (placas são normalmente lidas em um leitor Tecan SUNRISE a um comprimento de onda de 450 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm, utilizando o software Magellan V 6.3 para leitura e análise de dados para verificar o aparelho).

5 Valores de absorvência mais elevados do que a amostra de comparação mais duas vezes o desvio padrão da mesma são considerados positivos para esta técnica.

Na próxima etapa, o valor médio da amostra de comparação é subtraído do resto das cavidades da placa.

10 Os valores médios das cavidades de cada coluna são calculados (uma vez que a amostra de comparação para esta técnica tenha sido subtraída) comparando o valor médio de cada coluna ao valor médio do meio não suplementado e o meio suplementado com FCS ou com diferentes concentrações do sobrenadante da fração I, respectivamente.

15 Células em meio não suplementado são vistas como não proliferadoras (0%) e, portanto, o valor médio de absorvência nesta coluna é subtraído de todos os valores médios de todas as colunas.

O valor de absorvência do meio de referência (meio Ham F12 suplementado com 10% FCS) é tomado como o valor de proliferação 100%
20 e, por conseguinte, uma vez que o valor do meio não suplementado foi subtraído, todos os valores médios do ponto anterior são divididos por este valor para obter a percentagem de proliferação relativa ao meio de referência.

Com meios suplementados por entre 20% e 50% de fração I do sobrenadante, como regra geral, os percentuais de proliferação obtidos são
25 semelhantes ao meio de referência (meio com 10% de soro bovino fetal) ou muito mais elevados (meio com 50% do sobrenadante da fração I).

Os resultados da proliferação estão mostrados abaixo como percentagens.

Proliferação de células CHO (%) em meio Ham F12 suplementado com FCS ou S/Fr I
30

S/S	10% FCS (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 sem suplemento; FCS: soro bovino fetal; alb: albumina

Exemplo 5

5 Teste da proliferação de células da linhagem de células CHO com meio suplementado pelo sobrenadante da fração II + III.

O teste realizado foi idêntico ao teste anterior, suplementando os meios com a fração II + III do sobrenadante, em vez do sobrenadante da fração I.

10 Quanto aos resultados da proliferação, usando 20% do sobrenadante da fração II + III para suplementar o meio, os resultados são semelhantes aos obtidos com o meio de referência (suplementado com 10% de FCS) e quando os meios suplementados com 50% de fração II + III do sobrenadante são usados, os resultados da proliferação são superiores aos obtidos com o meio de referência.

15 Os resultados da proliferação são mostrados abaixo como percentagens.

Proliferação de células CHO (%) em meio Ham F12 suplementado com FCS e S/Fr-II+III (n=4)

S/S	10% FCS (2.5 mg (mg/ml alb)	20% S/FrII+III (4.8 mg/ml alb)	30% S/Fr.II+III (7.1 mg/ml alb)	40% S/Fr.II+III (9.5 mg/ml alb)	50% S/Fr.II+III (11.9 mg/ml alb)
0	100	85	104	123	160

S/S sem suplemento; FCS: soro bovino fetal; alb: albumina

Exemplo 6

20 Teste da proliferação de células da linhagem de células CHO com meio suplementado por fração II + III do sobrenadante com irradiação gama

O teste realizado foi idêntico ao teste anterior, suplementando o meio com a fração II + III do sobrenadante e irradiada com raios gama, nas doses de 25 e 35 kGy (quiloGrays).

Quanto aos resultados da proliferação, nenhuma diferença significativa mostrou existir entre os resultados obtidos com a fração II + III do sobrenadante, sem irradiação e com irradiação a 25 e 35 kGy.

Os resultados da proliferação estão mostrados abaixo como percentagens.

Proliferação de células CHO (%) em meio Ham F12 suplementado com FCS, S/Fr-II + III ou S/Fr-II + III irradiada com raios gama

S/S	10% FCS	50% S/Fr.II+III [G3]	50% S/Fr.II+III kGy	25 50% S/Fr.II+III 35 kGy
0	100	155	150	142

S/S sem suplemento; FCS: soro bovino fetal; kGy: kiloGrays

Exemplo 7

Teste da proliferação de células da linhagem de células Vero, com meio suplementado por irradiação gama da fração II + III do sobrenadante (25 kGy).

O teste realizado foi idêntico ao teste no Exemplo 1, utilizando como meio de cultura de base, meio essencial mínimo Dulbecco modificado (DMEM), e a linhagem de células Vero em vez da linhagem CHO.

A linhagem de células Vero consiste em células de rim de macaco verde Africano, a morfologia dessas células, sendo semelhante a fibroblastos (tipo fibroblastos) com um hábito de crescimento adesivo. A cultura usada vem da Coleção Europeia de Culturas de Células (ECACC), nº de catálogo 84.113.001.

Os resultados da proliferação obtidos mostram um resultado muito similar ou maior do que o obtido com o meio de referência acima de 30% de suplementação com fração II + III do sobrenadante com irradiação gama. O meio suplementado com 20% de fração II + III do sobrenadante

com irradiação gama dá resultados muito semelhantes ao meio de referência (meio básico suplementado com 10% de FCS).

Os resultados da proliferação estão mostrados abaixo como percentagens.

- 5 Proliferação de células Vero (%) em meio DMEM suplementado com FCS ou S/Fr-II+III (n=8) com irradiação gama

S/S	2% FCS (0,55% mg/ml alb)	FCS (1,310% mg/ml alb)	FCS (2,51% mg/ml alb)	25 kGy 10% S/Fr II+III (2,4 alb)	25 kGy 20% S/Fr II+III (4,8 alb)	25 kGy 30% S/Fr II+III (7,1 mg/ml alb)	25 kGy 40% S/Fr II+III (9,5 mg/ml alb)	25 kGy 50% S/Fr II+III (11,9 mg/ml alb)
0	77	104	100	65	71	82	84	82

S/S sem suplemento; FCS: soro bovino fetal; alb: albumina; kGy: kilo Grays

Exemplo 8

Subcultura da linhagem de células CHO com meio Ham F12 suplementada por 50% de fração II + III do sobrenadante (25 kGy).

5 Um frasco com uma cultura de células CHO geralmente próximo à confluência é usado.

O meio de cultura deve ser decantado.

A monocamada de células é lavada com solução salina tampoadada com fosfato (PBS) a uma temperatura entre 20°C e 37°C, com cerca de 10 ml por cada 25 cm² e decantada.

10 Uma solução contendo 0,05% de tripsina/EDTA 0,02% é adicionada (a tripsina pode ser recombinante ou de origem animal), usando 2 ml por cada 25 cm² de superfície cultivada. A solução está espalhada por toda a superfície para que forme uma película fina e o excesso de solução é decantado.

15 A garrafa deve ser mantida a uma temperatura entre 20°C e 37°C até que as células se separem da superfície.

Meio de cultura Ham F12 suplementado com 50% de fração II + III do sobrenadante (25 kGy) é adicionado entre 5 ml e 15 ml por frasco de cultura.

20 As células são dissociadas por agitação da garrafa ou pipetagem, e as células contadas.

Elas são despejadas em novas garrafas de cultura distribuídas na proporção entre 1:3 e 1:10.

25 O volume total do meio Ham F12 suplementado com 50% de fração II + III do sobrenadante (25 kGy) na nova garrafa de cultura deve ser de 0,2 a 0,3 ml/cm² da superfície da cultura.

A garrafa é incubada em uma incubadora de cultura de células a 37°C com umidade relativa elevada e uma concentração de CO₂ apropriadas para o meio de cultura utilizado (neste caso, 8%).

30 O meio de cultura deve ser trocado a cada um a três dias.

Depois de várias passagens utilizando o meio de cultura suplementado com 50% de S/Fr-II + III (25 kGy), observou-se que a cultura per-

maneceu viável e tinha capacidade de crescimento.

Viabilidade, o tempo de duplicação da população (PDT) e o número total de células em uma superfície de 75 cm² foram monitorados por 16 passagens consecutivas, resultando em uma rentabilidade média de 92,79%, um PDT médio de 73,8 horas e uma média total de células de 4,34 x 10⁶ células/75 cm². Os resultados obtidos usando o meio de referência durante nove passagens consecutivas tiveram viabilidade média de 97,81%, PDT médio de 27,49 horas e o número total médio de células de 1,28 x 10⁷ células/75 cm².

Em um segundo experimento, os mesmos parâmetros foram monitorados em células CHO cultivadas com 50%, 20% e 10% S/Fr-II + III durante 3 a 7 passagens. Para as células cultivadas em meio suplementado com 50% de S/Fr-II + III, um PDT de 103,22, viabilidade de 90,21% e 6,14 x 10⁶ células/75 cm² foram obtidos. Para as células cultivadas em meio suplementado com 20% de S/Fr-II + III, um PDT de 70,45, viabilidade de 94,89% e 7,72 x 10⁶ células/75 cm² foram obtidos. Para as células cultivadas em meio suplementado com 10% de S/Fr-II + III, um PDT de 83,04, viabilidade de 91,07% e 5,87 x 10⁶ células/75 cm² foram obtidos.

Exemplo 9

Subcultura da linhagem de células CHO com meio Ham F12 suplementada por 20% da fração II + III do sobrenadante (25 kGy).

A sub-cultura é realizada da mesma forma como no exemplo anterior, mas utilizando meio Ham F12 suplementado com 20% de fração II + III do sobrenadante (25 kGy) em vez dos 50%.

Em seguida a várias passagens usando o meio de cultura suplementado com 20% de S/Fr-II + III (25 kGy), observou-se que a cultura permaneceu viável e tinha capacidade de crescimento.

Neste caso, a viabilidade, o PDT e o número total de células em 75 cm² foram monitorados durante seis passagens consecutivas, a viabilidade média de 97,13%, PDT médio de 86,32 horas e o número total médio de células de 5,96 x 10⁶ células/75 cm².

Exemplo 10

- Estabilidade da Fr-II + III do sobrenadante, medida como percentagem de proliferação de células CHO, suplementada com 50% de Fr-II + III do sobrenadante reconstituído em Ham F12, em comparação com o meio suplementado com soro bovino fetal a 10%.

Tabela 1

Estabilidade liofilizada a 4°C

	T=0	T=105 dias	T= 112 dias	T= 168 dias
Placa 1	129,69	113,85	140,70	79,52
Placa 2	138,75	84,11	148,71	87,40
Média	134,22	98,98	144,71	83,46

- A Fr-II + III do sobrenadante permanece estável (percentagens de proliferação igual a $(100 \pm 20)\%$ ou superior que FCS) por pelo menos 168 dias na forma liofilizada, armazenada em um freezer (2°C a 8°C).

Tabela 2

Estabilidade reconstituída $\leq -18^\circ\text{C}$

Lote 1	T=0	T=98 dias	T=105 dias	T=113 dias
Placa 1	129,69	111,36	136,82	136,53
Placa 2	138,75	118,08	75,27	154,03
Média	134,22	114,72	106,05	145,28

Lote 2	T=0	T=28 dias	T=91 dias	T= 98 dias
Placa 1	79,52	159,77	76,00	132,29
Placa 2	87,40	184,16	171,67	133,30
Média	83,46	171,96	123,84	132,79

- Este material, reconstituído em meio de cultura Ham F12, é estável durante pelo menos 113 dias a uma temperatura inferior ou igual a -18°C (percentagens de proliferação celular igual ou maior do que no momento zero).

REIVINDICAÇÕES

1. Meio para a cultura de células de mamíferos, caracterizado pelo fato de que adicionalmente aos nutrientes usuais em meio de cultura basal para a cultura de células de mamíferos, compreende o sobrenadante da fração I do método de Cohn ou o sobrenadante da fração II + III do método de Cohn.

2. Meio de cultura de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os sobrenadantes das frações de Cohn são obtidos a partir de misturas (pools) de pelo menos 1.000 doadores humanos.

3. Meio de cultura de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o sobrenadante da fração de Cohn é seco.

4. Meio de cultura de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o sobrenadante da fração de Cohn é congelado.

5. Processo para a preparação de um meio de cultura de células de mamíferos, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a preparação do sobrenadante de fração I ou fração II + III do fracionamento de plasma humano de acordo com o método de Cohn compreende as etapas:

- precipitação com etanol
- separação do sobrenadante
- congelamento ou secagem

e, opcionalmente, os estágios de:

- diluição e/ou
- diálise ou diafiltração e/ou
- eliminação de agentes patogênicos;

e adição subsequente do sobrenadante preparado desta maneira para o meio de cultura basal.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o sobrenadante seco é reconstituído em meio de cultura basal, em água destilada ou deionizada e água apirogênica, ou em soluções salinas ou tampões comumente usados em cultura de células.

7. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o sobrenadante seco é reconstituído em meio de cultura basal.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que o plasma humano é obtido a partir de misturas (pools) de pelo menos 1.000 doadores humanos.

9. Uso de um meio de cultura que compreende o sobrenadante da fração I do método de Cohn ou o sobrenadante da fração II + III do método de Cohn, caracterizado pelo fato de ser para cultura de células de mamíferos.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS QUE COMPREENDE SOBRENADANTE DE ESTÁGIOS DE FRAÇIONAMENTO DE COHN, SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO"**.

5 A presente invenção refere-se aos meios de cultura de células de mamífero que compreendem sobrenadante de algumas das frações do fracionamento de plasma humano de acordo com o método de Cohn, mais especificamente, o sobrenadante das frações I e II + III. Quando o dito sobrenadante é adicionado como um suplemento do meio de cultura, fornece
10 vários nutrientes e fatores para a manutenção e/ou a proliferação efetiva de culturas de células de mamíferos. Além disso, a presente invenção refere-se ao processo de preparação e utilização do referido meio de cultura de células de mamíferos.