

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.01.03	(73) Titular(es): BAXTER HEALTHCARE SA THURGAUERSTRASSE 130 8152 GLATTPARK (OPFIKON) CH
(30) Prioridade(s): 2006.01.04 US 756419 P	BAXTER INTERNATIONAL INC US
(43) Data de publicação do pedido: 2012.11.14	(72) Inventor(es): MANFRED REITER AT WOLFGANG MUNDT AT ARTUR MITTERER AT LEOPOLD GRILLBERGER AT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.04.02 093/2014	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **MEIOS DE CULTURA CELULARES LIVRES DE OLIGOPEPTÍDEOS**

(57) Resumo:

SÃO PROVIDENCIADOS MEIOS DE CULTURA CELULARES LIVRES DE OLIGOPEPTÍDEOS QUE COMPREENDEM PELO MENOS 0,5 MG/L DE UMA POLIAMINA E MÉTODOS DE CULTIVAR CÉLULAS EM DITOS MEIOS DE CULTURA CELULARES LIVRES DE OLIGOPEPTÍDEOS QUE COMPREENDEM PELO MENOS 0,5 MG/L DE UMA POLIAMINA. TAMBÉM SÃO PROVIDENCIADOS MÉTODOS PARA EXPRESSAR PELO MENOS UMA PROTEÍNA NUM MEIO QUE COMPREENDE PELO MENOS 0,5 MG/L DE UMA POLIAMINA E MÉTODOS PARA PRODUZIR PELO MENOS UM VÍRUS NUM MEIO QUE COMPREENDE PELO MENOS 0,5 MG/L DE UMA POLIAMINA.

RESUMO**"MEIOS DE CULTURA CELULARES LIVRES DE OLIGOPEPTÍDEOS"**

São providenciados meios de cultura celulares livres de oligopeptídeos que compreendem pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina e métodos de cultivar células em ditos meios de cultura celulares livres de oligopeptídeos que compreendem pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina. Também são providenciados métodos para expressar pelo menos uma proteína num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina e métodos para produzir pelo menos um vírus num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

DESCRIÇÃO**"MEIOS DE CULTURA CELULARES LIVRES DE OLIGOPEPTÍDEOS"**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a meios de cultura celulares livres de oligopeptídeos que compreendem pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina e a métodos para cultivar células em ditos meios de cultura celulares livres de oligopeptídeos que compreendem pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina. A invenção também se refere a métodos para expressar pelo menos uma proteína num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina e a métodos para produzir pelo menos um vírus num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Para o cultivo das células, em particular de células eucariontes, e mais especificamente células de mamíferos, existe uma necessidade contínua de utilizar meios de cultura especiais que providenciem substâncias nutrientes que são necessárias para o crescimento eficiente das células e para a produção de produtos biológicos, especialmente biofarmacêuticos, tais como, por exemplo, proteínas recombinantes, anticorpos, vírus, antígenos virais e partículas tipo vírus. Para a produção eficiente de ditos produtos biológicos, é importante conseguir uma densidade celular ótima bem como um aumento da própria expressão proteica de modo a obter um rendimento máximo do produto.

As formulações de meios de cultura celulares têm sido suplementadas com uma gama de aditivos, incluindo componentes indefinidos, como soro bovino fetal (FCS), várias proteínas derivadas de animais e/ou hidrolisados proteicos de origem bovina, bem como hidrolisados proteicos

derivados de plantas ou leveduras.

Em geral, soro ou substâncias derivadas de soro, tais como, por exemplo albumina, transferrina ou insulina, podem compreender agentes indesejados que podem contaminar as culturas celulares e os produtos biológicos obtidos dos mesmos. Além disso, aditivos derivados de soro humano têm de ser testados para todos os vírus conhecidos, incluindo os vírus da hepatite e do VIH que podem ser transmitidos pelo soro. Além disso, o soro bovino e os produtos derivados do mesmo acarretam o risco de contaminação por BSE. Adicionalmente, todos os produtos derivados de soro podem ser contaminados por substâncias desconhecidas. Existem vários problemas na utilização de soro ou aditivos proteicos derivados de fontes humanas ou animais em culturas celulares (por exemplo, a qualidade variável na composição de diferentes lotes e o risco de contaminação com micoplasma, vírus ou BSE), particularmente se as células são utilizadas no fabrico de fármacos ou vacinas para administração humana.

Assim, têm sido feitas várias tentativas de providenciar sistemas hospedeiros e condições de cultivo eficientes, que não requerem soro ou outros compostos proteicos animais.

Tais meios livres de soro foram desenvolvidos na base de extratos proteicos derivados de plantas ou leveduras. Por exemplo, os hidrolisados de soja são conhecidos por serem úteis em processos de fermentação e por poderem potenciar o crescimento de muitos organismos, leveduras e fungos fastidiosos. O documento WO 96/26266 descreve que digestões papaicas de farinha de soja são uma fonte de carboidrato e azoto e que muitos dos componentes podem ser utilizados em culturas de tecidos. Franek et al. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688 - 692) descrevem os efeitos promotores do crescimento e produtividade de frações peptídicas de hidrolisados de trigo e soja

definidas.

O documento WO 96/15231 revela um meio livre de soro composto de um meio essencial mínimo sintético e de um extrato de levedura para a propagação de células de vertebrado e um processo de produção de vírus. Uma formulação de meio composta de um meio de cultura celular basal que compreende um péptido de arroz e um extrato de levedura e um digerido enzimático do mesmo e/ou um lípido de planta para crescimento de células animais é revelado no documento WO 98/15614. Um meio que compreende hidrolisado de soja purificado para o cultivo de células recombinantes é revelado no documento WO 01/23527. O documento WO 00/03000 revela um meio que compreende um hidrolisado de soja e um extrato de levedura, mas também requer a presença de formas recombinantes de proteínas animais, tais como fatores de crescimento.

O documento EP-A-0 481 791 descreve um meio de cultura definido bioquimicamente para cultivar células CHO fabricadas por engenharia genética, que é livre de proteína, lípido e carboidrato isolado de uma fonte animal, que compreende, ainda, uma insulina recombinante ou análogo da insulina, 1 % a 0,025 % p/v peptona de soja digerida com papaína e putrescina. O documento WO 98/08934 descreve uma cultura de células eucariontes livre de soro que compreende péptidos de soja hidrolisados (1 - 1000 mg/L), 0,01 a 1 mg/L putrescina e uma variedade de componentes derivados de animais, incluindo albumina, fetuína, várias hormonas e outras proteínas. Neste contexto, é de notar que a putrescina também é conhecida por estar compreendida em meios padrão, como DMEM/F12 de Ham numa concentração de 0,08 mg/L.

Os hidrolisados de plantas e/ou leveduras, contudo, são misturas indefinidas de oligopeptídeos e outros componentes e contaminantes desconhecidos. Além disso, a qualidade de lotes de hidrolisados disponíveis

comercialmente varia muito. Como resultado, existem grandes variações na produção de proteínas recombinantes ou produtos virais (uma variação de até um fator de 3) em função dos lotes de hidrolisados utilizados ("variação de lote para lote"). Esta desvantagem afeta a proliferação das células, bem como a expressão proteica de cada célula.

Em resumo, os meios conhecidos no estado da arte são suplementados com proteínas ou extratos peptídicos derivados de animais, plantas ou leveduras; ou com versões recombinantes de proteínas, tais como, por exemplo, insulina, fator de crescimento tipo insulina ou outros fatores de crescimento.

Assim, existe uma necessidade de um meio de cultura celular que é livre de proteínas e/ou oligopeptídeos animais, vegetais e fúngicas, de modo a ultrapassar os problemas anteriormente mencionados. Além disso, existe uma necessidade atual de aumentar o rendimento das proteínas recombinantes expressas ou de qualquer outro produto de expressão e de providenciar um meio de cultura celular ótimo para a produção de produtos biológicos, tais como aqueles utilizados como produtos farmacêuticos ou vacinas em humanos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objeto da presente invenção providenciar meios de cultura celulares livres de oligopeptídeos. Um objeto adicional da presente invenção é providenciar métodos para cultivar células em ditos meios, bem como métodos para expressar de forma eficiente proteínas recombinantes e/ou métodos para a produção eficiente de vírus.

É um outro objeto da presente invenção eliminar hidrolisados derivados de animais, plantas e/ou leveduras e providenciar meios que não compreendem quaisquer proteínas ou oligopeptídeos suplementares adicionados.

Surpreendentemente, a adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina a meios de cultura celulares providencia um

efeito vantajoso, não só promovendo o crescimento celular mas também aumentando a expressão proteica e/ou viral por célula. Dito efeito vantajoso inesperado pode ser conseguido mesmo em meios livres de oligopeptídeos.

Além disso, os meios livres de oligopeptídeos utilizados num método de acordo com a presente invenção permitem o crescimento celular consistente e rendimento aumentado de produtos desejados, particularmente de proteínas alvo, tais como proteínas recombinantes e/ou vírus, independentemente da qualidade ou variações entre lotes de quaisquer hidrolisados proteicos. A suplementação específica de meios de cultura celulares com uma concentração específica de poliaminas atua para aumentar o crescimento celular, a produtividade específica da célula e a densidade final celular.

Assim, os meios utilizados num método de acordo com a presente invenção são mais favoráveis para a expressão de proteínas recombinantes, produção de vírus e taxa de crescimento celular quando comparados com os meios conhecidos na arte. Além disso, o meio livre de oligopeptídeos utilizado num método de acordo com a presente invenção obvia a adição de hidrolisado proteico ao meio de cultura celular.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um gráfico que descreve o efeito da adição de 2,0 mg/L putrescina.2HCl na produtividade volumétrica de FV111-CoA, expressa em [Unidades por Litro por Dia], de células GD8/6 cultivadas em meio BAV ao longo do tempo de cultivo, expresso em [dias]. Seta = Dia 11: Adição de Putrescina.2HCl (2,0 mg/l)

A Figura 2 mostra um quadro que compara o efeito da adição de putrescina opcionalmente em combinação com a suplementação adicional com Fe (11) e Cu (11) na produtividade volumétrica e celular específica (QP, expressa em [Unidades por Litro por Dia], qp, expressa em

[mU por células 10E06 por dia]) e na taxa de crescimento específica μ , expressa como taxa de crescimento específica por dia em $[d^{-1}]$ de células GD8/6 cultivadas em meio BAV.

A Figura 3 mostra um quadro que compara o efeito da putrescina e/ou ornitina na taxa de crescimento específica (μ absoluta, μ relativa) e na produtividade celular específica (qp absoluta, expressa em [mU por 10E06 células por dia], qp relativa, expressa em %) de células GD8/6 cultivadas em meio BAV.

A Figura 4 mostra um quadro que compara o efeito da putrescina e espermina na taxa de crescimento específica (μ absoluta, μ relativa) e na produtividade celular específica (qp absoluta, qp relativa) de células GD8/6 cultivadas em meio BAV.

A Figura 5 mostra um quadro que compara o efeito da putrescina e etanolamina no crescimento específico (μ . absoluta, μ relativa) e na produtividade celular específica (qp absoluta, qp relativa) de células GD8/6 cultivadas em meio BAV.

A Figura 6 mostra um gráfico que descreve o efeito da adição de 3,6 mg/L putrescina.2HCl no título do vírus MVA médio, expresso em $[TCID50/ml \times 10^8]$. -: sem adição de Putrescina, Putr.: com adição de 3,6 mg/L putrescina.2HCl.

A Figura 7 mostra um gráfico que descreve o efeito da adição de várias concentrações de putrescina.2HCl, expressa em [mg/l], no título do vírus MVA médio, expresso em $[TCID50/ml \times 10^6]$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção providencia:

1. Um método para expressar pelo menos uma proteína, que compreende as etapas de:

- (a) providenciar uma cultura de células;
- (b) introduzir, pelo menos, uma sequência de ácidos nucleicos que compreende uma sequência que codifica, pelo menos, uma proteína selecionada do grupo de fator de

coagulação VII, fator de coagulação VIII, fator de coagulação IX, vWF, ADAMTS13 e furina nas células;

(c) selecionar as células que transportam a sequência de ácidos nucleicos e

(d) expressar a proteína nas células num meio livre de oligopeptídeos que compreende, pelo menos, 0,5 mg/L de uma poliamina.

2. O método de [1], em que as células são cultivadas por cultivo quimiostato.

3. O método de [1] ou [2], em que as células são células CHO, células 293 ou células BHK.

4. O método de qualquer uma de [1] a [3], em que a combinação célula/proteína é selecionada do grupo que consiste em células CHO/fator de coagulação VIII, células CHO/fator de coagulação VII, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina, células 293/fator de coagulação IX.

5. O método de qualquer uma de [1] a [4], em que a combinação célula/proteína é célula CHO/fator de coagulação VIII, em que o meio compreende Fe(II) e Cu(II) adicionados e em que a poliamina é putrescina.

6. O método de qualquer uma de [1] a [5], em que a poliamina é selecionada do grupo que consiste em cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina e combinações das mesmas.

7. O método de qualquer uma de [1] a [6], em que o meio compreende ornitina, putrescina ou espermina ou combinações das mesmas.

8. O método de qualquer uma de [1] a [7], em que a poliamina é produzida sinteticamente.

9. O método de qualquer uma de [1] a [8], em que a poliamina está presente no meio de cultura numa concentração que oscila entre 0,5 e 30 mg/L.

10. O método de qualquer uma de [1] a [9], em que o meio é definido quimicamente.

Um aspeto da revelação refere-se a um meio de cultura

celular livre de oligopeptídeos que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

A menos que indicado o contrário, os valores de concentração indicados ao longo deste documento referem-se à forma base livre do(s) componente(s).

O termo "poliamina" refere-se a qualquer um do grupo de poliaminas biogénicas, que são policatiões orgânicos derivados de aminoácidos aromáticos ou catiónicos. As poliaminas são compostas de carbono, nitrogénio e hidrogénio e compreendem dois ou mais grupos amino. As poliaminas têm uma ou mais cargas positivas e um esqueleto hidrofóbico. O termo abrange, por exemplo, moléculas selecionadas do grupo que consiste em cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina e combinações das mesmas. Numa modalidade da invenção, o meio de cultura livre de oligopeptídeos compreende ornitina ou putrescina ou espermina ou combinações das mesmas.

Numa outra modalidade do meio de cultura celular livre de oligopeptídeos utilizado num método de acordo com a invenção, a poliamina é originária de uma fonte que não é um hidrolisado proteico. Numa modalidade, a poliamina é produzida sinteticamente.

Numa modalidade da invenção, a concentração da poliamina é pelo menos cerca de 0,5 mg/L, noutra modalidade pelo menos cerca de 1 mg/L, numa modalidade adicional pelo menos cerca de 2 mg/L, ainda numa outra modalidade pelo menos 5 mg/L, em ainda outra modalidade pelo menos 8 mg/L, e numa modalidade adicional pelo menos 10 mg/L.

Numa modalidade da invenção, a concentração da poliamina oscila entre cerca de 0,5 mg/L a cerca de 30 mg/L, noutra modalidade entre cerca de 0,5 mg/L a cerca de 20 mg/L, numa modalidade adicional entre cerca de 1,0 mg/L a cerca de 20 mg/L, numa modalidade adicional entre cerca de 2,0 mg/L a cerca de 20 mg/L, numa modalidade adicional entre cerca de 2 mg/L a cerca de 10 mg/L, numa modalidade

alternativa entre cerca de 2 mg/L a cerca de 8 mg/L e numa modalidade adicional entre cerca de 2 mg/L a cerca de 5 mg/L no meio.

As concentrações indicadas anteriormente são as concentrações respectivas da poliamina pura. Se um derivado de poliamina ou uma poliamina que compreende o composto é utilizado, a concentração do grupo poliamina está nos intervalos especificados anteriormente. Por exemplo, 2 mg/L Putrescina.2HCl é equivalente a uma concentração de Putrescina de cerca de 1,095 mg/L (sem .2HCl).

O termo "meio de cultura celular livre de oligopeptídeos", de acordo com a invenção, refere-se a um meio livre de proteínas que não compreende oligopeptídeos, tais como, por exemplo, oligopeptídeos derivados de um hidrolisado proteico. Numa modalidade, o meio não compreende oligopeptídeos tendo vinte ou mais aminoácidos. Numa modalidade da presente invenção, o meio não compreende oligopeptídeos tendo quinze ou mais aminoácidos. Numa outra modalidade da invenção, o meio não compreende oligopeptídeos tendo dez ou mais aminoácidos. Numa modalidade, o meio não compreende oligopeptídeos tendo sete ou mais aminoácidos, numa outra modalidade não compreende oligopeptídeos tendo cinco ou mais aminoácidos, ainda numa outra modalidade, o meio não compreende oligopeptídeos tendo três ou mais aminoácidos. De acordo com uma modalidade adicional da presente invenção, o meio não compreende oligopeptídeos tendo dois ou mais aminoácidos.

O meio utilizado num método de acordo com a invenção pode compreender, opcionalmente, glutathione e/ou pelo menos uma forma estável de glutamina, tal como, por exemplo, L-alanil-L-glutamina. O termo "glutathione", conforme utilizado aqui, descreve um tripéptido composto dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina incluindo a forma oxidada da glutathione, isto é, glutathione dissulfeto, um dímero de glutathione formado por uma ligação dissulfido

entre as cadeias laterais sulfrídilo da cisteína durante o processo de oxidação.

Numa modalidade da presente invenção, o meio de cultura celular livre de oligopeptídeos não compreende oligopeptídeos tendo três ou mais aminoácidos, mas pode compreender, opcionalmente, glutatona.

Noutra modalidade, o meio de cultura celular livre de oligopeptídeos não compreende oligopeptídeos tendo dois ou mais aminoácidos, mas pode compreender, opcionalmente, glutatona e/ou pelo menos uma forma estável de glutamina.

Proteínas e/ou oligopeptídeos típicos que são evitados nos meios utilizados num método de acordo com a invenção são aqueles encontrados no soro e em substâncias derivadas do soro, tais como, por exemplo, albumina, transferrina, insulina ou outros fatores de crescimento, bem como em formas recombinantes dos mesmos, ou oligopeptídeos de hidrolisados de plantas ou leveduras ou em formas ultrafiltradas dos mesmos.

O meio de cultura livre de oligopeptídeos utilizado num método de acordo com a invenção pode ser baseado em qualquer meio basal, tal como DMEM, F12 de Ham, Meio 199, McCoy ou RPMI geralmente conhecido de alguém habilitado na arte. O meio basal pode compreender um número de ingredientes, incluindo aminoácidos, vitaminas, sais orgânicos e inorgânicos e fontes de carboidrato, estando cada ingrediente presente numa quantidade que suporta o cultivo de uma célula, sendo ditas quantidades geralmente conhecidas de uma pessoa habilitada na arte. O meio pode compreender substâncias auxiliares, tais como substâncias tamponantes, por exemplo, bicarbonato de sódio, antioxidantes, estabilizadores para contrariarem o stress mecânico ou inibidores de protease. Se necessário, pode ser adicionado um tensioativo não iônico, tal como co-polímeros e/ou misturas de polietilenoglicóis e polipropilenoglicóis (por exemplo, Pluronic F68[®], SERVA).

Numa modalidade do meio de cultura utilizado num método de acordo com a presente invenção, a poliamina controla a síntese de ADN e ARN e/ou a proliferação celular e/ou a diferenciação celular e/ou a estabilização da membrana e/ou a proteção do ADN anti-oxidativa.

Numa modalidade, a adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina a um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos aumenta a expressão proteica e/ou viral nas células cultivadas. Noutra modalidade, a expressão proteica ou título viral nas células cultivadas pode ser aumentado em, pelo menos, 50% pela adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina a um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos. Ainda numa outra modalidade, dito aumento é de, pelo menos, 60%. Ainda numa outra modalidade, a produtividade celular específica é aumentada, pelo menos, duas vezes pela adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina a um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos; noutra modalidade, a produtividade celular específica é aumentada menos três vezes. Ainda numa outra modalidade, a adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina resulta num aumento na expressão proteica e/ou título viral em, pelo menos, 400%; numa modalidade adicional em, pelo menos, 500%; noutra modalidade em, pelo menos, 600%; numa modalidade adicional em, pelo menos, 700%.

Numa modalidade, a taxa de crescimento específica das células cultivadas pode ser aumentada pela adição de pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina a um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos. Numa modalidade adicional, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 10%. Ainda numa outra modalidade, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 20%. Ainda numa outra modalidade, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 50%. Numa modalidade adicional, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 70%. Noutra

modalidade, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 80%. Ainda numa outra modalidade, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 90%. Ainda numa outra modalidade, dita taxa de crescimento específica pode ser aumentada em 100%.

Numa modalidade adicional da presente invenção, o meio é definido quimicamente. O termo "definido quimicamente", conforme utilizado aqui, significará que o meio não compreende quaisquer suplementos indefinidos, tais como, por exemplo, extratos de componentes animais, órgãos, glândulas, plantas ou leveduras. Em conformidade, cada componente de um meio definido quimicamente é definido com precisão.

A presente revelação refere-se, ainda, a um método de cultivar células, que compreende as etapas de:

- (a) providenciar um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, conforme descrito aqui, e
- (b) propagar as células no meio para formar uma cultura celular.

A presente invenção não está limitada a qualquer tipo de células. Exemplos de tipos de células incluem células de mamíferos, células de insetos, células de aves, células de bactérias e células de leveduras. As células podem ser, por exemplo, células estaminais ou células recombinantes transformadas com um vetor para a expressão de genes recombinantes ou células transfetadas com um vírus para produzir produtos virais. As células também podem ser, por exemplo, células que produzem uma proteína de interesse sem transformação recombinante, por exemplo, uma célula B que produz um anticorpo que pode ser transformado num estado imortalizado, por exemplo, por infecção vírica como infecção pelo vírus de Epstein Barr. As células também podem ser, por exemplo, células primárias, por exemplo, células de embrião de galinha ou linhas de células primárias. Úteis são as células utilizadas para a produção de vírus *in*

vitro. Exemplos específicos de células úteis incluem células BSC, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293, células RK, células Per.C6 e células de embrião de galinha.

As células utilizadas de acordo com a presente invenção podem ser cultivadas, por exemplo, por um método selecionado do grupo de cultivo em lotes, cultivo em lotes alimentados, cultivo por perfusão e cultivo quimostato, todos os quais são geralmente conhecidos na especialidade.

A presente invenção refere-se, ainda, a um método para expressar pelo menos uma proteína, tal como, por exemplo, uma proteína heteróloga ou autóloga ou uma proteína recombinante que compreende as etapas de:

- a) providenciar uma cultura de células;
- b) introduzir, pelo menos, uma sequência de ácidos nucleicos que compreende uma sequência que codifica, pelo menos, uma proteína nas células;
- c) selecionar as células selecionadas do grupo de fator de coagulação VII, fator de coagulação VIII, fator de coagulação IX, vWF, ADAMTS13 e furina que transporta a sequência de ácidos nucleicos e
- d) expressar a proteína nas células num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

O meio da etapa d) é um meio livre de oligopeptídeos de acordo com a presente invenção. Numa modalidade adicional da presente invenção, as células da cultura da etapa a) foram crescidas num meio de cultura celular livre de oligopeptídeos de acordo com a presente invenção. Noutra modalidade, as etapas a) a d) são conduzidas num meio de cultura celular livre de oligopeptídeos de acordo com a invenção.

A sequência de ácidos nucleicos que compreende uma sequência que codifica, pelo menos, uma proteína pode ser um vetor. O vetor pode ser entregue por um vírus ou pode ser um plasmídeo. A sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína pode ser um gene específico ou uma parte biologicamente funcional do mesmo. Numa modalidade, a proteína é, pelo menos, uma parte biologicamente ativa de um fator de coagulação sanguíneo, tal como Fator VIII ou, pelo menos, uma parte biologicamente ativa de uma proteína envolvida na produção de glóbulos vermelhos e angiogénese, tais como eritropoietina ou um anticorpo monoclonal.

A sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência que codifica, pelo menos, uma proteína selecionada do grupo de fator de coagulação VII, fator de coagulação VIII, fator de coagulação IX, vWF, ADAMTS13 e furina.

Numa modalidade da presente invenção, o ácido nucleico compreende, ainda, outras sequências adequadas para a expressão controlada de uma proteína, tais como sequências promotoras, potenciadores, caixas TATA, locais de iniciação da transcrição, poliligantes, locais de restrição, sequências poli A, sequências processadoras de proteína, marcadores de seleção e afins, que são geralmente conhecidas de uma pessoa habilitada na arte.

Numa modalidade da invenção, as células são selecionadas do grupo de células CHO, células 293 e células BHK.

De acordo com outra modalidade da presente invenção, as seguintes linhas de células podem ser transformadas com um vetor recombinante para a expressão dos respetivos produtos: células CHO para a produção de fatores de coagulação recombinantes, por exemplo, fator VII e/ou fator VIII anticorpos e/ou monoclonais, células BHK para a produção de eritropoietina recombinante, vírus de Epstein Barr transformado, células B humanas imortalizadas para a

produção de anticorpos humanos. Combinações célula/proteína úteis são, por exemplo, células CHO/fator de coagulação VIII, células CHO/fator de coagulação VII, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina e células 293/fator de coagulação IX.

Numa modalidade adicional da presente invenção, a expressão de, pelo menos, uma proteína por células sendo cultivadas num meio de acordo com a presente invenção é aumentada quando comparada com a expressão da proteína por células que não são cultivadas num meio da presente invenção. Noutra modalidade, dita expressão é aumentada em, pelo menos, 10%, de acordo com uma modalidade adicional em, pelo menos, 50%.

Aqui é descrito um método para produzir, pelo menos, um vírus ou pelo menos uma parte de um vírus, que compreende as etapas de:

- a) providenciar uma cultura de células;
- b) infectar as células com pelo menos um vírus;
- c) selecionar as células infectadas com vírus; e
- d) propagar pelo menos o vírus nas células num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

O meio da etapa d) pode ser um meio livre de oligopeptídeos de acordo com a presente invenção. As células da cultura da etapa a) podem ter sido crescidas num meio de cultura celular livre de oligopeptídeos de acordo com a presente invenção. As etapas a) a d) podem ser conduzidas num meio de cultura celular livre de oligopeptídeos de acordo com a invenção.

O vírus utilizado no método pode ser qualquer vírus, tal como, por exemplo, poxvírus, por exemplo, vírus vaccinia ou vaccinia atenuado; coronavírus, por exemplo vírus SARS; ortomixovírus, por exemplo vírus da influenza A ou B; paramixovírus; retrovírus, por exemplo Lentivírus; togavírus, por exemplo vírus de Ross River; flavivírus, por exemplo vírus West Nile, vírus da Febre Amarela, ou vírus

FSME (isto é, vírus da encefalite transmitido por carraças); enterovírus, por exemplo vírus da hepatite A; picornavírus; arenavírus; herpesvírus ou adenovírus. O vírus pode ser Vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA). O vírus pode ser propagado de acordo com a invenção para a produção da respetiva vacina.

O vírus pode ser um vírus de tipo selvagem, um vírus atenuado, um vírus reagrupado ou um vírus recombinante ou combinações das mesmas, por exemplo, atenuado e recombinante. Além disso, em vez de serem utilizados viriões reais para infetar as células com um vírus, pode ser utilizado um clone de ácido nucleico infeccioso. Também podem ser utilizados viriões divididos.

O método para produzir um vírus pode ser utilizado para produzir composições imunogénicas que compreendem um vírus, um antígeno de vírus ou uma partícula tipo vírus.

As células utilizadas no método para produzir um vírus podem ser selecionadas do grupo que consiste em células de mamíferos, células de insetos, células de aves, células de bactérias e células de leveduras. As células utilizadas no método para produzir um vírus de acordo com a presente invenção são selecionadas do grupo que consiste em células Vero e células de embrião de galinha.

Combinações úteis de células com vírus para produzir um vírus ou parte de um vírus são, por exemplo, célula Vero/vaccinia atenuado, célula Vero/Vaccinia, célula Vero/Hepatite A, célula Vero/vírus da Influenza, célula Vero/vírus de West Nile, célula Vero/Vírus SARS, célula Vero/vírus da Febre Amarela e células de embrião de galinha/vírus FSME. Numa modalidade da invenção, a combinação célula/vírus é células de embrião de galinha/Vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA).

Métodos de cultivo úteis incluem cultivo em lotes, cultivo de lotes alimentados, cultivo de perfusão e cultivo quimiostato.

A presente invenção será agora, ainda, ilustrada nos exemplos seguintes, sem ser limitada pelos mesmos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação do meio BAV

Meio livre de oligopeptídeos (meio BAV) foi preparado com meio basal DMEM/F12 de Ham (1:1) que compreende sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros componentes (Life technologies, Pó 32500). Também foram adicionados L-glutamina (600 mg/L), ácido ascórbico (20mM), etanolamina (25 mM), Synperonic® (SERVA) (0,25 g/L), selenito de sódio (50 nM). Além disso, aminoácidos essenciais foram suplementados ao meio de cultura celular: L-Asparagina.H₂O 20 mg/L, L-cisteína.HCl.H₂O 15 mg/L, L-cistina.2 HCl 20 mg/L, L-Prolina 35 mg/L, L-triptofano 20 mg/L.

Exemplo 2: Determinação de contagens de células

As contagens de células de células suspensas ou células imobilizadas foram determinadas por contagem com um contador de células CASY®, conforme descrito por Schärfe et al., Biotechnologie in LaborPraxis 10: 1096 - 1103 (1988), ou por extração com ácido cítrico e coloração fluorescente do núcleo seguido de contagem com um NucleoCounter® (Chemometec, DK). A taxa de crescimento específica (μ) é calculada a partir do aumento das densidades celulares (X_t) e/ou a taxa de diluição (D) do estado estável de cultivos quimostatos de células suspensas durante um dado intervalo de tempo (t):

$$\mu = D + \ln (X_t/X_0)/t$$

Exemplo 3: Determinação de atividade de FVIII

A atividade do fator VIII (FVIII) (conferir Figuras 1 a 5) foi medida através de um ensaio cromogénico (Chromogenic, Suécia).

Exemplo 4: Cálculo do QP volumétrico e produtividade específica das células (qp)

A produtividade volumétrica (QP) é calculada a partir

da quantidade de unidades de atividade produzidas por litro de volume de reator por dia (U/L/d) no sistema de produção.

A produtividade celular específica (qp) é definida como a quantidade específica de proteína produzida (U ou mg) por número de células por dia.

Exemplo 5: Condições de cultura de células a grande escala

Culturas de células de células de mamíferos recombinantes (por exemplo, células CHO que expressam de forma estável Fator VIII, tais como células GD8/6) foram crescidas em suspensão numa cultura quimiostato em biorreatores 10 L. As condições de cultivo de 37 °C, saturação de oxigénio 20%, e pH 7,0 a 7,1 foram mantidas constantes. As culturas foram fornecidas com uma alimentação constante de meio BAV.

Exemplo 6: Efeito da adição de uma poliamina na expressão de FVIII

Células GD8/6 foram crescidas em cultura quimiostato num biorreator 10 L conforme descrito no Exemplo 5 com uma alimentação contínua de meio BAV durante 11 dias, resultando numa produtividade diminuída de < 100U/L/d. Pela adição de putrescina.2HCl (2 mg/L) a expressão volumétrica de FVIII aumentou em 800% (cf. Figura 1). Em conformidade, a putrescina pode ser claramente identificada como o fator motor da expressão celular específica para a linha de células GD8/6.

Exemplo 7: Efeito da adição de uma poliamina e Fe (II) e Cu II na expressão de FVIII

Células GD8/6 foram crescidas em cultivo quimiostato num biorreator de 10 L, conforme descrito no Exemplo 5, resultando numa produtividade média de 271 U/L/D, com uma baixa produtividade celular específica e taxa de crescimento específicas. Pela adição de Putrescina.2HCl (2mg/L) a expressão de FVIII aumentou para 870 U/L/D, principalmente devido a uma produtividade celular específica aumentada. A suplementação adicional com Fe (II)

e Cu (II) numa concentração como é, de outra forma, tipicamente compreendida em hidrolisados de soja conduziu a uma taxa de crescimento específica aumentada de aproximadamente $0,60 \text{ d}^{-1}$ e pode ser atingido um aumento da produtividade celular específica para mais de $1700 \text{ mU}/10\text{E}06$ células/dia. Nestas condições, foi conseguida uma produtividade volumétrica de mais de 2685 U/L/D . Um aumento adicional da densidade celular resultou numa produtividade volumétrica superior a 3000 U/L/D . A produtividade volumétrica máxima de um hidrolisado de soja que compreende meio em condições de fermentação comparáveis foi 2000 a 2500 U/L/D , indicando que um meio quimicamente definido que compreende apenas Putrescina e 2 iões de metal adicionais é superior a qualquer hidrolisado de soja que compreende formulação de meio investigada neste processo previamente (conferir Figura 2).

Exemplo 8: Condições de cultura de células a pequena escala

Foram realizadas experiências a pequena escala com células GD8/6 em cultura de suspensão em frascos de agitação Techne num volume de trabalho de 200 ml num lote em modo re-alimentado a 37°C , sem controlo do pH e pO_2 . As culturas foram facultadas com meio BAV, conforme definido anteriormente, adicionalmente suplementado com Putrescina.2HCl, Ornithina.HCl, Espermina.4HCl ou Etanolamina ou combinações das mesmas no intervalo de 0-18 mg/L (equivalente a 0-10 mg/L da amina biogénica sem .HCl (conferir Figuras 3 a 5).

Exemplo 9: Efeito da adição de várias poliaminas e combinações de poliaminas na expressão de FVIII

Células GDB/6 de uma cultura com meio BAV, conforme descrito no Exemplo 8, foram centrifugadas e transferidas para frascos de agitação Techne com um volume de trabalho de 200 ml e incubadas a uma densidade celular de cerca de $1-2\text{E}06$ células/ml com meio definido, suplementado com etanolamina, putrescina, ornitina e/ou espermina, conforme

indicado nas Figuras 3, 4 e 5. Ornitina, que é um precursor da putrescina na via das amins biogénicas, poderia substituir parcialmente a putrescina numa forma dependente da concentração. A adição de ornitina a diferentes concentrações aos meios que compreendem putrescina.2HCl resultou num aumento adicional de produtividades de FVIII e taxas de crescimento específicas (conferir Figura 3). Contudo, a etanolamina, que não é uma poliamina, de acordo com a presente invenção, não poderia nem substituir a putrescina em qualquer concentração investigada nem o aumento da concentração da etanolamina num meio que compreende putrescina resultou num aumento significativo das produtividades volumétricas ou taxa de crescimento específicas (conferir Figura 5). Uma experiência adicional em condições semelhantes mostrou que a espermina, outro intermediário na via das amins biogénicas, também poderia substituir a putrescina numa forma dependente da concentração (conferir Figura 4).

Exemplo 10: Efeito da adição de uma poliamina na produção de vírus MVA

Culturas de células primárias de embriões de galinha foram cultivadas em frascos de agitação Techne (volume de trabalho de 200 ml) utilizando um meio livre de péptidos (meio FM) sem e com suplementação de 3,6 mg/L Putrescina.2 HCl.

Foi preparado meio FM com meio M199 basal que compreende sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e other componentes (Life technologies, Pó 31150). Também foram adicionados NaHCO₃ (ad 4,4 g/L), Gentamicina.SO₄ (50 mg/L) e Neomicina.SO₄ (50mg/L).

Culturas de células foram infetadas com vírus MVA e os sobrenadantes foram analisados para título viral num ensaio TCID₅₀. Pela adição de Putrescina, o título viral médio (n = 16 amostras cada) poderia ser aumentado em aproximadamente 50% (conferir Figura 6).

Exemplo 11: Efeito da adição de várias doses de uma poliamina na produção de vírus MVA

Culturas de células primárias de embriões de galinha foram cultivadas em frascos de agitação Techne (volume de trabalho de 200 ml) utilizando um meio livre de péptidos (meio CEM) sem e com suplementação de 3,6 e 9 mg/L Putrescina.2 HCl.

O meio CEM foi preparado com meio DMEM/F12 de HAM (1:1) que compreende sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros componentes (Life technologies, Pó 32500). Também foram adicionados NaHCO₃ (2 g/L) L-glutamina (600 mg/L), ácido ascórbico (20mM), etanolamina (25 uM), Synperonic ® (SERVA) (0,25 g/L), selenito de sódio (50 nM), FeSO₄.7H₂O (600mg/L), Gentamicina.SO₄ (50 mg/L) e Neomicina.SO₄ (50mg/L). Além disso, aminoácidos essenciais foram suplementados ao meio de cultura celular. Além disso, aminoácidos essenciais foram suplementados ao meio de cultura celular: Cisteína.HCl.H₂O 15 mg/L, L-Cistina.2 HCl 20 mg/L, L-Prolina 35 mg/L, L-Triptofano 20 mg/L.

Culturas de células foram infetadas com vírus MVA e os sobrenadantes foram analisados título viral num ensaio TGID50. Pela adição de Putrescina com 9 mg/L, o título viral médio (n = 4 amostras cada) poderia ser aumentado em aproximadamente 60% (conferir Figura 7).

As cláusulas seguintes também são descritas aqui:

Um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que a poliamina é selecionada do grupo que consiste em cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina e combinações das mesmas.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que a poliamina é produzida sinteticamente.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que a poliamina está presente no meio de cultura numa concentração que oscila entre cerca de 0,5 e cerca de 30 mg/L.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que o meio não compreende oligopeptídeos tendo vinte ou mais aminoácidos.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que o meio não compreende oligopeptídeos tendo três ou mais aminoácidos, opcionalmente que compreendem glutatona.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que o meio não compreende oligopeptídeos tendo dois ou mais aminoácidos, opcionalmente que compreendem glutatona e/ou pelo menos uma forma estável de glutamina.

O meio de cultura celular livre de oligopeptídeos, de acordo com a cláusula 1, em que o meio é quimicamente definido.

Um método de cultivar células que compreende as etapas de:

(a) providenciar um meio de cultura celular livre de oligopeptídeos de acordo com a cláusula 1,

e

(b) propagar as células no meio para formar uma cultura de células.

O método de acordo com a cláusula 9, em que as células são selecionadas do grupo que consiste em células de mamíferos, células de inseto, células de aves, células de bactérias e células de leveduras.

Um método para expressar pelo menos uma proteína que compreende as etapas de:

(a) providenciar uma cultura de células;

(b) introduzir, pelo menos, uma sequência de ácidos nucleicos que compreende uma sequência que codifica, pelo

menos, uma proteína nas células;

(c) selecionar as células que transportam a sequência de ácidos nucleicos e

(d) expressar a proteína nas células num meio que compreende pelo menos 0,5 mg/L de uma poliamina.

O método, de acordo com a cláusula 11, em que o meio é um meio livre de oligopeptídeos de acordo com a cláusula 1.

O método, de acordo com a cláusula 11, em que a proteína é selecionada do grupo de fator de coagulação VII, fator de coagulação VIII, fator de coagulação IX, vWF, ADAMTS13 e furina.

O método, de acordo com a cláusula 11, em que as células são células CHO, células 293 ou células BHK.

O método, de acordo com a cláusula 11, em que a combinação célula/proteína é selecionada do grupo que consiste em células CHO/fator de coagulação VIII, células CHO/fator de coagulação VII, células CHO/ADAMTS13, células CHO/furina, células 293/fator de coagulação IX.

Um método para produzir, pelo menos, um vírus que compreende as etapas de:

(a) providenciar uma cultura de células;

(b) infetar as células com, pelo menos, um vírus;

(c) selecionar as células infetadas com vírus e

(d) propagar o, pelo menos, um vírus nas células num meio que compreende, pelo menos, 0,5 mg/L de uma poliamina.

O método, de acordo com a cláusula 16, em que o meio é um meio livre de oligopeptídeos de acordo com a cláusula 1.

O método, de acordo com a cláusula 16, em que o vírus é selecionado do grupo de poxvírus, coronavírus, ortomixovírus, paramixovírus, retrovírus, togavírus, flavivírus, enterovírus, picornavírus, arenavírus, herpesvírus e adenovírus.

O método, de acordo com a cláusula 16, em que o vírus é selecionado do grupo de vírus vaccinia, vírus SARS, vírus da influenza A, vírus da influenza B, Lentivírus, vírus de

Ross River, vírus de West Nile, vírus da Febre Amarela, vírus FSME e vírus da hepatite A.

O método, de acordo com a cláusula 16, em que as células são células Vero ou células de embrião de galinha. O método, de acordo com a cláusula 16, em que a combinação células/vírus é selecionada do grupo que consiste em células Vero/vaccinia atenuado, células Vero/vaccinia, células Vero/hepatite A, células Vero/vírus da influenza, células Vero/vírus de West Nile, células Vero/vírus SARS, células Vero /vírus da Febre Amarela, células de embrião de galinha/vírus FSME e células de embrião de galinha/Vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA).

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- WO 9626266 A [0006]
- WO 9615231 A [0007]
- WO 9815614 A [0007]
- WO 0123527 A [0007]
- WO 0003000 A [0007]
- EP 0481791 A [0008]
- WO 9808934 A [0008]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **FRANEK et al.** *Biotechnology Progress*, 2000, vol.
- **SCHÄRFE et al.** *Biotechnologie in LaborPraxis*, 16, 688-692 [0006] 1988, vol. 10, 1096-1103 [0057]

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para expressar, pelo menos, uma proteína que compreende as etapas de:

- (a) providenciar uma cultura de células;
- (b) introduzir, pelo menos, uma sequência de ácidos nucleicos que compreende uma sequência que codifica, pelo menos, uma proteína selecionada do grupo de fator de coagulação VII, fator de coagulação VIII, fator de coagulação IX, vWF, ADAMTS 13 e furina nas células;
- (c) selecionar as células que transportam a sequência de ácidos nucleicos e
- (d) expressar a proteína nas células num meio livre de oligopeptídeos que compreende, pelo menos, 0,5 mg/L de uma poliamina.

2. O método da reivindicação 1, em que as células são cultivadas por cultivo quimiostato.

3. O método da reivindicação 1 ou 2, em que as células são células CHO, células 293 ou células BHK.

4. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a combinação célula/proteína é selecionada do grupo que consiste em células CHO/fator de coagulação VIII, células CHO/fator de coagulação VII, células CHO/AD-AMTS 13, células CHO/furina, células 293/fator de coagulação IX.

5. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a combinação célula/proteína é célula CHO/fator de coagulação VIII, em que o meio compreende Fe(II) e Cu(II) adicionados e em que a poliamina é putrescina.

6. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a poliamina é selecionada do grupo que consiste em cadaverina, putrescina, espermidina, espermina, agmatina, ornitina e combinações das mesmas.
7. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o meio compreende ornitina, putrescina ou espermina ou combinações das mesmas.
8. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a poliamina é produzida sinteticamente.
9. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a poliamina está presente no meio de cultura numa concentração que oscila entre 0,5 e 30 mg/L.
10. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o meio é definido quimicamente.

Figura 1

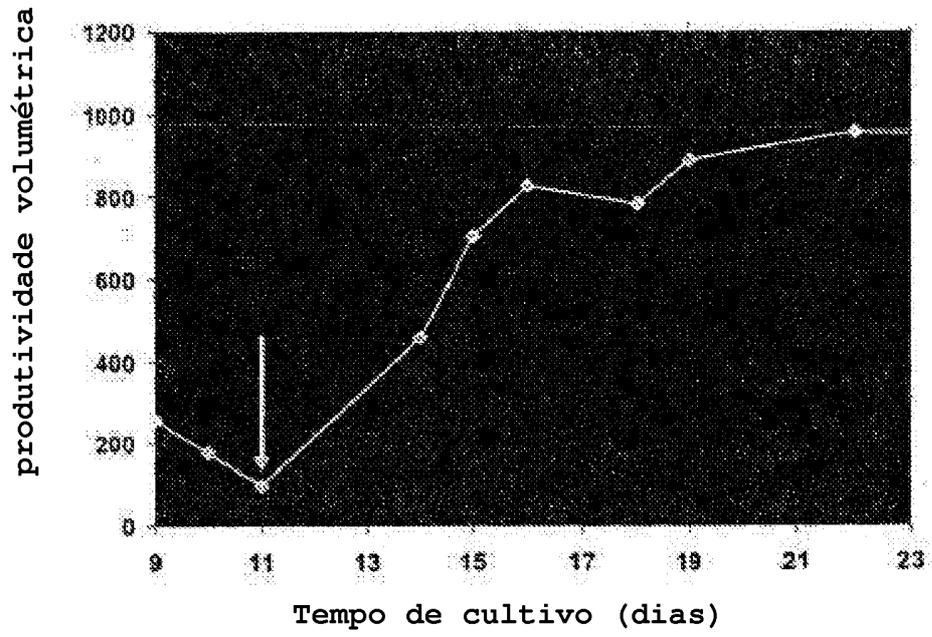


Figura 2

	QP [U/L/D]	QP [mU/10E06 cells/ day]	μ [d ⁻¹]
Meio BAV sem suplemento	271	236	0,37
Meio BAV + Putrescina, 2HCl (2 mg/L)	870	671	0,41
meio BAV + Putrescina, 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) ad 2,3 x concentração + Cu (II) ad 2,0 x concentration	1393	958	0,59
meio BAV + Putrescina, 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) ad 2,3 x concentração + Cu (II) ad 12,5 x concentration	2685	1744	0,63
meio BAV + Putrescina, 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) ad 2,3 x concentração + Cu (II) ad 12,5 x concentração om densidade celular aumentada	3107	1756	0,63

Figura 3

	qp absoluta [mU/10E06 células/dia]	qp relativa [%]	μ absoluta [d ⁻¹]	μ relativa [%]
meio BAV sem amina biogénica adicional	172	100	0,19	100
putrescina, 2HCl (2 mg/L)	697	405	0,34	179
ornitina, HCl (2 mg/L)	457	266	0,34	179
ornitina, HCl (10 mg/L)	587	341	0,37	195
putrescina, 2HCl (2 mg/L) + ornitina, HCl (2 mg/L)	806	467	0,36	189
putrescina, 2HCl (2 mg/L) + ornitina, HCl (10 mg/L)	1050	610	0,39	205

Figura 4

	qp absoluta [mU/10E06 células/día]	qp relativa [%]	μ absoluta [d-1]	μ relativa [%]
putrescina, 2HCl (2 mg/L)	2303	100	0,61	100
espermina, 4HCl (0,4 mg/L)	1331	58	0,59	97
espermina, 4HCl (2 mg/L)	2639	115	0,60	98
espermina, 4HCl (10 mg/L)	2651	115	0,59	97

Figura 5

	qp absoluta [mU/10E06 células/dia]	qp relativa [%1]	μ absoluta [d-1]	μ relativa [%1]
etanolamina padrão meio BAV (1,53 mg/L) concentração padrão = controlo negativo	172	100	0,19	100
etanolamina (ad 3,83 mg/L)	188	109	0,23	118
etanolamina (ad 15,3 mg/L)	183	106	0,22	118
etanolamina (ad 38,3 mg/L)	171	100	0,23	125
putrescina, 2HCl (2 mg/L) + etanolamina (ad 3,83 mg/L)	545	317	0,36	193
putrescina, 2HCl (2 mg/L) + etanolamina (ad 15,3 mg/L)	609	354	0,32	173
putrescina, 2HCl (2 mg/L) + etanolamina (ad 38,3 mg/L)	553	322	0,32	172

Figura 6

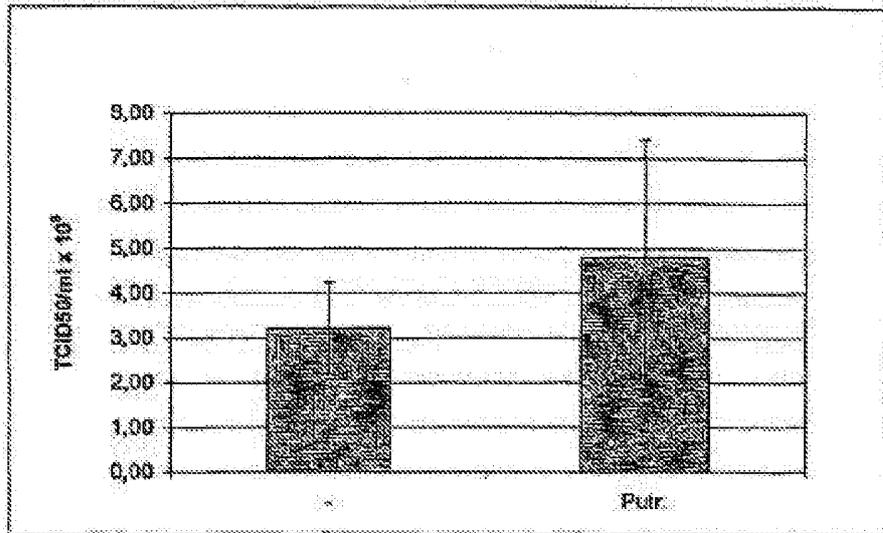


Figura 7

