

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

(22) Data de pedido: <b>2003.07.08</b>	(73) Titular(es): <b>BAXTER HEALTHCARE S.A.</b> <b>THURGAUERSTRASSE 130 8152 GLATTPARK</b> <b>(OPFIKON)</b> CH
(30) Prioridade(s): <b>2002.07.09 US 394243 P</b>	<b>BAXTER INTERNATIONAL INC.</b> US
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.04.06</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.09.05</b> <b>186/2012</b>	(72) Inventor(es): <b>MANFRED REITER</b> AT <b>WOLFGANG MUNDT</b> AT <b>LEOPOLD GRILLBERGER</b> AT <b>BARBARA KRAUS</b> AT
	(74) Mandatário: <b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b> <b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **MEIO ISENTO DE PROTEÍNA ANIMAL PARA CULTURA DE CÉLULAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS ISENTO DE PROTEÍNA ANIMAL COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE PÉPTIDOS NÃO DERIVADOS DE ANIMAIS DERIVADOS DE HIDROLISADO DE SOJA E HIDROLISADO DE LEVEDURA. A INVENÇÃO PROPORCIONA TAMBÉM UM PROCESSO DE CULTURA ISENTO DE PROTEÍNA ANIMAL, EM QUE AS CÉLULAS SÃO CULTIVADAS, PROPAGADAS E PASSADAS SEM COMPONENTES DERIVADOS DE ANIMAIS. ESTE PROCESSO É ÚTIL PARA CULTURA DE CÉLULAS, TAIS COMO CÉLULAS RECOMBINANTES OU CÉLULAS INFETADAS COM UM VÍRUS, E PARA PRODUÇÃO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS ATRAVÉS DE PROCESSOS DE CULTURA DE CÉLULAS SOB CONDIÇÕES DESPROVIDAS DE COMPONENTES PROTEICOS ANIMAIS.

## **RESUMO**

### **"MEIO ISENTO DE PROTEÍNA ANIMAL PARA CULTURA DE CÉLULAS"**

A presente invenção refere-se a meio de cultura de células isento de proteína animal compreendendo uma combinação de péptidos não derivados de animais derivados de hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura. A invenção proporciona também um processo de cultura isento de proteína animal, em que as células são cultivadas, propagadas e passadas sem componentes derivados de animais. Este processo é útil para cultura de células, tais como células recombinantes ou células infectadas com um vírus, e para produção de produtos biológicos através de processos de cultura de células sob condições desprovidas de componentes proteicos animais.

## **DESCRIÇÃO**

### **"MEIO ISENTO DE PROTEÍNA ANIMAL PARA CULTURA DE CÉLULAS"**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente divulgação refere-se a meios de cultura de células isentos de proteína animal compreendendo uma combinação de um hidrolisado de soja e um hidrolisado de levedura. A invenção refere-se a processos de cultura isentos de proteína animal, em que as células podem ser cultivadas, propagadas e passadas sem proteínas animais. Estes processos são úteis para cultura de células, tais como células recombinantes ou células infectadas com um vírus, e para produção de produtos biológicos através de processos de cultura de células.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Para cultura de células, particularmente células eucarióticas, e mais especificamente células de mamífero, existe uma necessidade constante de utilizar meios de cultura especiais que tornam disponíveis as substâncias nutrientes e as substâncias nutrientes de crescimento que são necessárias para um crescimento eficiente das células e para a produção das proteínas ou vírus que são desejados. As formulações de meios de cultura de células têm sido suplementadas com uma variedade de aditivos, incluindo componentes indefinidos como soro fetal de vitelo (FCS), várias proteínas derivadas de animais e/ou hidrolisados proteicos de origem bovina.

Em geral, soro ou substâncias derivadas de soro, tais como albumina, transferrina ou insulina, podem conter agentes indesejáveis que podem contaminar as culturas e os produtos

biológicos obtidos a partir destas. Além disso, os aditivos derivados de soro humano têm de ser testados para todos os vírus conhecidos, incluindo hepatite e HIV, que podem ser transmitidos através do soro. Além disso, o soro bovino e produtos derivados deste, por exemplo tripsina, correm o risco de contaminação por BSE. Adicionalmente, todos os produtos derivados de soro podem estar contaminados com agentes desconhecidos. No caso do soro ou de aditivos proteicos que sejam derivados de fontes humanas ou de outros animais em culturas de células, existem numerosos problemas (p.ex., a qualidade variável e a composição de diferentes lotes e o risco de contaminação com micoplasma, vírus ou agentes da BSE), particularmente se as células forem utilizadas para produção de agentes medicinais ou vacinas para administração humana.

Portanto, têm sido feitas muitas tentativas para proporcionar sistemas hospedeiros e condições de cultura eficientes que não necessitem de soro ou de outros compostos proteicos animais. Meio simples isento de soro inclui tipicamente meio básico, vitaminas, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos, e talvez componentes adicionais para tornar o meio nutricionalmente complexo. Tais meios, no entanto, frequentemente são nutricionalmente insuficientes e têm de ser suplementados com suplementos proteicos derivados de animais ou versões recombinantes de proteínas utilizadas em cultura de células, tais como insulina, fator de crescimento semelhante a insulina ou outros fatores de crescimento.

Para evitar a utilização de suplementos proteicos animais em meio de cultura de células isento de soro, têm sido

feitas várias tentativas para proporcionar meios de cultura de células que sejam completamente isentos de proteínas.

Cinatl *et al.*, *Cell Biology International* 17: 885-895 (1993) descrevem o desenvolvimento de um meio (PFK-1) específico para propagação contínua de células VERO numa superfície de cultura de polivinil-formal (PVF).

WO 96/15231 divulga meio isento de soro composto por um meio essencial mínimo sintético e extrato de levedura para propagação de células de vertebrado e processo de produção de vírus.

Uma formulação de meio composta por um meio de cultura de células basal compreendendo um péptido de arroz e um extrato de levedura ou uma digestão enzimática deste e/ou um lípido vegetal para crescimento de células animais é divulgada em WO 98115614.

Um meio compreendendo hidrolisado de soja purificado para a cultura de células recombinantes é divulgado em WO 01/23527.

WO 00/03000 divulga 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.

Para uma produção eficiente de produtos biológicos, tais como vírus ou proteínas recombinantes, é importante que seja alcançada uma densidade celular ótima para se obter um rendimento máximo do produto.

Portanto, existe uma necessidade atual para aumentar o crescimento, a atividade metabólica e a densidade de células, e para proporcionar um meio de cultura celular ótimo desprovido de proteínas animais para produção de produtos biológicos, tais como os utilizados como produtos medicinais ou vacinas em humanos. Além disso, o processamento a jusante, p.ex. a purificação do produto desejado a partir do meio de cultura pode ser mais eficaz em termos de custos e de tempo se não estiverem presentes proteínas animais no meio. Além disso, proteínas animais imunogénicas indesejadas podem induzir reações imunológicas deletérias, as quais são evitadas com a prática da presente invenção.

#### **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção é definida nas reivindicações.

É um objeto da presente divulgação proporcionar meios de cultura isentos de proteína animal. Ao realizar este e outros objetos, proporciona-se um meio de cultura de células isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura. O hidrolisado de soja pode estar presente numa concentração de pelo menos 0,05% (p/v) e o hidrolisado de levedura está presente numa concentração de pelo menos 0,05% (p/v). Opcionalmente, o hidrolisado de soja pode estar presente numa concentração inferior a 1,0% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar presente numa concentração inferior a 0,3% (p/v). Opcionalmente, o hidrolisado de soja pode estar presente numa concentração de entre cerca de 0,2% (p/v) a cerca de 0,6% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar presente numa concentração de entre cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,2% (p/v). Opcionalmente, o hidrolisado de soja pode estar

presente numa concentração de entre cerca de 0,25% (p/v) a cerca de 0,35% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar presente numa concentração de entre cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,15% (p/v). Opcionalmente, o hidrolisado de soja pode estar presente numa concentração de cerca de 0,3% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar presente numa concentração de cerca de 0,1% (p/v). Opcionalmente, o meio compreende 3 partes em peso de hidrolisado de soja e 1 parte em peso de hidrolisado de levedura. O hidrolisado de levedura pode ser um hidrolisado de levedura purificado ultrafiltrado, em que pelo menos 40% do referido hidrolisado de levedura tem um peso molecular inferior ou igual a 500 Daltons. Semelhantemente, o hidrolisado de soja pode ser um hidrolisado de soja purificado ultrafiltrado, em que pelo menos 40% do referido hidrolisado de soja tem um peso molecular inferior ou igual a 500 Daltons.

A invenção proporciona também métodos de cultivo de culturas confluentes de células dependentes da superfície compreendendo o proporcionar um meio compreendendo hidrolisado de soja a uma concentração de 0,05% (p/v) a 1% (p/v) e hidrolisado de levedura a uma concentração de 0,05% (p/v) a 0,3% (p/v); e propagação das células no meio para formar a cultura de células confluentes, e passagem e subcultura das células enquanto em contacto com uma protease não derivada de animais. Outras concentrações de hidrolisados, tal como exemplificado acima, podem também ser empregues de acordo com a invenção. As células podem ser células animais, tais como células de inseto, células de ave, células de mamífero, células estaminais e, de preferência, as células que são utilizadas para a produção *in vitro* de vírus. As células podem também ser células recombinantes. Células exemplares incluem as selecionados

de entre o grupo consistindo em células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLC-PK, 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 e células RK.

A invenção proporciona também um processo de cultura de células confluentes isento de proteína animal, compreendendo: proporcionar um meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; crescimento de células dependentes da superfície no meio, e passagem e subcultura das células crescidas no meio, enquanto em contacto com uma protease não derivada de animal, para obter uma cultura de células confluentes. As células podem ser células animais, células recombinantes e/ou células infetadas com um vírus. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

Além disso, a divulgação proporciona uma cultura de células cultivadas num meio isento de proteína animal, em que o meio compreende hidrolisado de soja a uma concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1% (p/v) e hidrolisado de levedura a uma concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). Outras concentrações dos hidrolisados, tal como exemplificado acima, podem também ser empregues. As células podem ser células animais, células recombinantes e/ou células infetadas com um vírus. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.



Adicionalmente, são aqui descritos métodos para produção de vírus, compreendendo: proporcionar uma cultura de células que foram criadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com um vírus; e incubação das células infetadas para propagar o vírus. As células podem ser células animais e/ou células recombinantes e, em particular, células de mamífero. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui. Os vírus a produzir nas células cultivadas podem ser escolhidos de entre uma variedade de vírus que se sabe infetarem o tipo celular cultivado. Por exemplo, quando se utiliza uma cultura de células de mamífero, os vírus podem ser escolhidos a partir dos géneros de ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus e adenovírus. O vírus usado pode ser um vírus de tipo selvagem, um vírus atenuado, um vírus remisturado, ou um vírus recombinante. Além disso, em vez de serem utilizados viriões reais para infetar as células com um vírus, um clone de ácido nucleico infeccioso pode ser utilizado de acordo com métodos de transfecção de clones infecciosos conhecidos dos especialistas no campo da virologia.

São aqui descritos métodos para produção de poxvírus (incluindo vírus vacínia), compreendendo: proporcionar uma cultura de células que foram cultivadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com poxvírus; e incubação das células infetadas para propagar o poxvírus. As células podem ser células de mamífero e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

Além disso, são aqui descritos métodos para produção de coronavírus (incluindo a Síndrome Respiratória Aguda Grave associada a coronavírus), compreendendo: proporcionar uma cultura de células que foram cultivadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com coronavírus; e incubação das células infectadas para propagar o coronavírus. As células podem ser células de mamífero e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

Além disso, são aqui descritos métodos para produção de ortomixovírus, compreendendo: proporcionar uma cultura de células que foram criadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com ortomixovírus; e incubação das células infectadas para propagar ortomixovírus. O ortomixovírus pode ser vírus influenza A, B ou C. As células podem ser células de mamífero e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

São aqui descritos métodos para produção de vírus de Ross River, compreendendo o proporcionar de uma cultura de células que foram criadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com vírus de Ross River; e incubação das células infectadas para propagar o vírus de Ross River. As células podem ser células de mamífero e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

São aqui descritos métodos para produção de Flavivírus, compreendendo o proporcionar de uma cultura de células que foram criadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com Flavivírus; e incubação das células infectadas para propagar o Flavivírus. O Flavivírus pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em vírus da febre-amarela, e vírus quiméricos derivados deste, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de origem na carraça, vírus do Nilo Ocidental e vírus da hepatite C. As células podem ser células animais e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui.

São aqui descritos métodos de produção de composições imunogénicas compreendendo um vírus ou um antigénio do vírus, em que o método compreende o proporcionar de uma cultura de células que foram criadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com o vírus; incubação das células infectadas para propagar o vírus; colheita do vírus ou do antigénio do vírus produzido; preparação de uma composição imunogénica do vírus ou antigénio do vírus colhido. As células podem ser células animais e/ou células recombinantes. As características do meio e os tipos celulares aqui estabelecidos são também aplicáveis aqui. O vírus ou antigénio do vírus colhido pode ser submetido a purificação.

São aqui descritos métodos de produção de composições imunogénicas compreendendo um vírus ou antigénio de um

vírus, em que o método compreende: proporcionar uma cultura de células de mamífero, em que as células são selecionadas a partir do grupo de células de rim de macaco, células de rim de bovino, células de rim de cão, células de rim de porco, células de rim de ratinho, células de rim de rato, células de rim de ovelha, células de rim de hamster e células humanas que foram criadas num meio de cultura isento de proteína animal compreendendo um hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura; infecção das células com um vírus selecionado a partir do grupo de ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus e adenovírus; incubação da cultura de células para propagar o vírus; colheita do vírus ou antigénio do vírus assim produzido; e preparação de uma composição imunogénica do vírus ou antigénio do vírus colhido.

Adicionalmente, são aqui descritas culturas de células infetadas com ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, poxvírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus ou adenovírus, em que as células são cultivadas em meio isento de proteína animal, em que o meio compreende hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura. O hidrolisado de soja pode estar numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). Outras concentrações de hidrolisados, tal como exemplificado acima, podem também ser empregues.

São aqui descritas preparações de ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus ou

adenovírus que são isentas de proteínas animais, incluindo versões produzidas de forma recombinante destas, a partir do meio, em que a preparação pode ser obtida através de cultura das células infetadas com vírus influenza, num meio isento de proteína animal, em que o meio compreende hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura. O hidrolisado de soja pode estar numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1% (p/v) e o hidrolisado de levedura pode estar numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). Outras concentrações dos hidrolisados, tal como exemplificado acima, podem também ser empregues. Estas preparações virais são adequadas para utilização para produzir antigénios virais e vacinas após processamento adicional.

Estes e outros aspetos da invenção tornar-se-ão evidentes para o perito na técnica tendo em vista a explicação e os dados apresentados abaixo.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

O termo "meio isento de proteína animal", nas suas várias formas gramaticais, refere-se a um meio que não é suplementado com proteínas nem componentes proteicos de eucariotas multicelulares superiores não vegetais (isto é, vertebrados), que possuam as estruturas secundária, terciária e quaternária características das proteínas tal como ocorrem na natureza. Proteínas típicas que são evitadas são as verificadas no soro e em substâncias derivadas do soro, tais como albumina, transferrina, insulina e outros fatores de crescimento. Versões produzidas de forma recombinante de proteínas animais, que podem conter componentes bacterianos imunogénicos, são também evitadas de acordo com a invenção, e não estão

presentes no meio isento de proteína animal aqui descrito. As proteínas e componentes proteicos animais devem ser distinguidos de proteínas, pequenos polipéptidos e oligopéptidos não animais que possam ser obtidos a partir de plantas (geralmente de cerca de 10-30 aminoácidos de comprimento), tais como o feijão de soja, e eucariotas inferiores, tais como levedura. É claro que, uma vez que o meio é colocado em contacto ou inoculado com as células a propagar, o meio conterá proteínas animais derramadas ou segregadas por essas células, incluindo quaisquer proteínas recombinantes expressas por células geneticamente modificadas, se tais células forem cultivadas. Assim, o termo meio isento de proteína animal, e materiais biológicos e preparações produzidas com este, não deve ser interpretado como exigindo a ausência de proteínas derramadas ou segregadas pelas células propagadas no meio, mas refere-se sim a uma falta de suplementação direta do meio com proteínas e componentes proteicos animais obtidos a partir de fontes animais ou semelhantes produzidos de forma recombinante.

O termo "meio basal", nas suas várias formas gramaticais, é um meio sintético, tal como DMEM, F12 de HAM, Meio 199 ou RPMI, ou combinações destes, e outros que são conhecidos da literatura ou estão comercialmente disponíveis. De acordo com a invenção, todos os meios sintéticos, que não contenham proteínas animais, podem ser utilizados em combinação com a combinação de hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura. O meio basal pode compreender vários ingredientes, incluindo aminoácidos, vitaminas, sais orgânicos e inorgânicos, fontes de hidratos de carbono, estando cada ingrediente presente numa quantidade que permita a cultura de uma célula *in vitro*. Por exemplo, pode

ser utilizado meio DMEM/F12 de HAM (1:1) como meio basal. O meio pode conter substâncias auxiliares, tais como substâncias tampão como bicarbonato de sódio, estabilizantes de oxidação, estabilizantes para contrabalançar o stress mecânico ou inibidores de proteases. Se necessário, um tensioativo não iônico, tal como polipropilenoglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 ou PLURONIC F-108) pode ser adicionado ao meio como agente anti-espuma. Estes agentes são geralmente utilizados para proteger as células dos efeitos negativos do arejamento uma vez que, sem a adição de um tensioativo, as bolhas de ar ascendentes e que rebentam podem conduzir a danos dessas células que estão localizadas na superfície destas bolhas de ar ("pulverização"). A quantidade de tensioativo não iônico está de preferência entre cerca de 0,05 e cerca de 10 g/L. Tipicamente entre cerca de 0,1 e cerca de 5 g/L. Além disso, o meio pode também conter ciclodextrina ou derivados desta, tipicamente entre cerca de 0,001 g/L e cerca de 1 g/L.

O meio aqui descrito compreende hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura, que podem ser adicionados a um meio basal. O termo "hidrolisado" inclui uma digestão enzimática da peptona de soja ou extrato de levedura. O hidrolisado pode ser obtido a partir de uma pluralidade de peptona de soja ou de preparações de extrato de levedura, respetivamente, que podem ser ainda mais digeridos enzimaticamente (por exemplo, através de papaína), e/ou formados através de autólise, termólise e/ou a plasmólise. Os hidrolisados podem também ser obtidos comercialmente, tal como Hy-Soy, Hy-Yeast 412 e Hi-Yeast 444, a partir de fontes tais como Quest International, Norwich, New York,

OrganoTechnie, SA, França; ou Deutsche Hefewerke GmbH, Alemanha. Fontes de extratos de levedura são também divulgadas em WO 98/15614. Fontes de extratos de levedura e hidrolisados de soja são também divulgadas em WO 00/03000.

Os hidrolisados utilizados em meios aqui descritos são de preferência purificados a partir de uma fração em bruto, porque as impurezas que poderiam interferir com uma cultura eficiente são de preferência eliminadas durante esta purificação, melhorando assim a consistência do hidrolisado. A purificação pode ser feita através de ultrafiltração ou através de cromatografia em Sephadex, por exemplo, com Sephadex G25 ou Sephadex G10 ou materiais equivalentes, cromatografia de permuta iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão por tamanho ou cromatografia de "fase inversa". Estes processos são conhecidos no campo. Utilizando estes métodos, podem ser selecionadas as frações que contêm hidrolisado de soja ou de levedura de peso molecular definido, de preferência  $\leq 1000$  Dalton, de maior preferência  $\leq 500$  Dalton, ainda de preferência  $\leq 350$  Dalton. Pelo menos 90% do hidrolisado tem, de preferência, um peso molecular  $\leq 1000$  Dalton. Os pesos moleculares médios dos hidrolisados de soja e de levedura estão, de preferência, entre cerca de 220 e 375 Dalton. O valor do pH do hidrolisado de soja e do hidrolisado de levedura deve estar no intervalo entre cerca de 6,5 e 7,5. O teor de azoto total deve estar entre cerca de 8 e 11%, de preferência, entre 9,0 e 10,0% e o teor de cinzas  $\leq 18\%$ . Um hidrolisado vantajoso caracteriza-se pela característica de ter um teor de aminoácidos livres entre cerca de 5 e 30%. O teor de endotoxinas, se existirem, deve ser  $< 500$  U/g.



Um meio aqui descrito tem a seguinte constituição: meio mínimo sintético (meio DMEM/F12 de HAM (1:1) (1-25 g/L), hidrolisado de soja (0,5-10 g/L) e hidrolisado de levedura (0,5-3 g/L), L-glutamina (0,05-1 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (0,1-10 g/L). O pH do meio está entre pH 6,8 e 7,6, de preferência entre pH 7,0 e 7,3.

Tal como é evidente para o perito na técnica, o termo "cerca de", no contexto de valores numéricos e intervalos, refere-se a valores ou intervalos que se aproximam ou estão perto dos valores ou intervalos citados tal que a invenção possa funcionar como pretendido, tal como tendo promovido um grau desejado de crescimento celular, tal como é evidente a partir dos ensinamentos aqui contidos, e aplica-se a todos os valores. Assim, este termo engloba valores para além dos resultantes de erro sistemático.

Foi surpreendentemente verificado que um meio basal isento de proteína animal suplementado com hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja dentro do intervalo de acordo com a presente divulgação é mais favorável para a taxa de crescimento celular, atividade metabólica celular e densidade final de células, em comparação com os meios descritos na técnica anterior. Isto foi ainda mais surpreendente tendo em vista o ensinamento de WO 98/15614 mostrando que concentrações mais elevadas de péptidos vegetais são menos ótimas. Com um meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja tal como aqui descrito, as células apresentaram maior taxa de crescimento, maior densidade celular final da biomassa e maior atividade metabólica (expressa em consumo de oxigénio em % por min) em comparação com meio compreendendo hidrolisado de soja ou hidrolisado de

levedura sozinho, mesmo se a concentração final de hidrolisado de levedura ou hidrolisado de soja adicionado isoladamente ao meio for equivalente à soma da concentração de hidrolisado combinado. Por exemplo, uma concentração final de cerca de 0,4% (p/v) de hidrolisado de levedura sozinho no meio teve um efeito inibidor no crescimento celular e na densidade celular. Um meio compreendendo 0,4% (p/v) ou concentrações mais elevadas de hidrolisado de soja não atingiu uma densidade celular mais elevada que um meio compreendendo 0,3% (p/v). No entanto, um meio compreendendo uma combinação de hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura numa concentração final de hidrolisado total de 0,4% (p/v) mostrou um aumento significativo na atividade metabólica das células, no crescimento celular e na densidade celular final.

De acordo com a invenção, a soma da quantidade do hidrolisado de soja e de levedura no meio deve estar entre cerca de 0,2% (p/v) e cerca de 0,6% (p/v) com uma razão mais elevada de hidrolisado de soja no meio em comparação com hidrolisado de levedura. Uma razão ótima entre o hidrolisado de soja e de levedura deve ser de cerca de 3:1 (soja/levedura), respetivamente.

O meio tal como aqui descrito é em particular útil para cultivar células. Dentro do âmbito da invenção, o termo "células" significa um termo genérico e engloba a cultura de células individuais, tecidos, órgãos, células de inseto, células de ave, células de mamífero, células primárias, linhas celulares contínuas, células estaminais e/ou células geneticamente modificadas, tais como células recombinantes expressando um polipeptídeo ou proteína heteróloga. Células recombinantes incluem, por exemplo, células CHO ou células

BHK expressando polipéptidos ou proteínas heterólogos, tais como um fator de crescimento ou um fator sanguíneo. Células frequentemente utilizadas para a propagação de vírus incluem células VERO e células CV-1.

Células de mamífero adequadas para cultura em meio de cultura celular, tal como aqui descrito incluem as de origem humana, que podem ser células primárias derivadas de uma amostra de tecido, estirpes de células diplóides, células transformadas ou linhas celulares estabelecidas. Células de mamífero podem incluir células humanas e não-humanas semelhantes. Células de mamífero de origem não-humana podem ser células de rim de macaco, células de rim bovino, células de rim de cão, células de rim de porco, células de rim de coelho, células de rim de ratinho, células de rim de rato, células de rim de ovelha, células de rim de hamster, células de ovário de hamster chinês ou uma célula animal derivada de qualquer tecido. Em particular, células de mamífero que podem ser cultivadas no meio de cultura podem ser células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLC-PK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células 293, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293 e células RK. Exemplos ou células recombinantes incluem células CHO expressando o fator VIII, FII, FIX, FX, vWF, por exemplo, todas as quais são conhecidas dos peritos na técnica.

Os termos "células contínuas" ou "linha celular contínua" (CCL), nas suas várias formas gramaticais, significa

células cultivadas que se replicam indefinidamente e são capazes de crescer em cultura em suspensão ou cultura em larga escala em biorreator. O crescimento ilimitado de CCL permite a cultura a longo prazo a partir de um substrato de células padronizadas e baixos custos. As linhas celulares de mamífero podem ser selecionadas a partir do grupo de células CHO, células COS, células VERO, células LLK-MK2, células NS-1, células MDBK, células MDCK, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células CV-1, células de rim de coelho (RK) e outras linhas celulares tal como divulgado por Butler *et al.*, *BIOS Scientific Publisher* pág. 1-24 (1992). As CCL são de preferência testadas quanto à ausência de agentes adventícios, tais como bactérias, fungos, micoplasma, protozoários e vírus.

O termo "cultura de células", nas suas várias formas gramaticais, refere-se a células cultivadas em suspensão, garrafas rolantes, balões e semelhantes. Abordagens de larga escala, tais como biorreatores, incluindo a cultura de células aderentes ligadas a microtransportadores em fermentadores agitados, estão também incluídas. Além disso, é possível não só cultivar células dependentes da superfície, como também utilizar as técnicas de cultura em suspensão com os meios da invenção. Se as células forem cultivadas em microtransportadores, o microtransportador pode ser selecionado a partir do grupo de microtransportadores baseado em dextrano, colagénio, plástico, gelatina e celulose e outros, tal como descrito em Butler, Spier & Griffiths, *Animal cell Biotechnology* 3: 283-303 (1988). Transportadores porosos, tais como p.ex. Cytoline<sup>®</sup> ou Cytopore<sup>®</sup>, bem como transportadores baseados em dextrano, tais como DEAE-dextrano (Cytodex 1<sup>®</sup>), dextrano revestido com amina quaternária (Cytodex 2<sup>®</sup>) ou

transportadores baseados em gelatina, tais como dextrano revestido com gelatina (Cytodex 3<sup>®</sup>) são adequados. Estes transportadores podem ser obtidos em Pharmacia.

As células são de preferência cultivadas a partir da ampola para a biomassa no meio isento de proteína animal e mantidas sob condições de meio de cultura durante o crescimento da cultura celular e o processo de produção do produto. São de preferência utilizadas células que estavam já adaptadas ao meio. Verificou-se que não só se alcançavam rendimentos maiores com tais células preadaptadas, como também a sua estabilidade para cultura é também claramente melhorada através da utilização do meio de acordo com a invenção.

O termo "cultura", nas suas várias formas gramaticais, refere-se à manutenção das células *in vitro* sob condições permissivas para crescimento e viabilidade contínua. As células de mamífero são tipicamente cultivadas numa incubadora de células a cerca de 37°C, com o meio de cultura tendo um pH ótimo no intervalo de cerca de 6,8 a 7,6, de preferência entre 7,0 e 7,3. As células em cultura de fornadas podem ter uma mudança completa do meio cada 2 a 3 dias, ou mais ou menos frequentemente, se necessário. As células em cultura de perfusão (p.ex., em biorreator ou fermentador) podem ter uma mudança para meio fresco numa base contínua de recirculação. As abordagens de cultura podem incluir, dependendo do contexto e da necessidade, a subcultura, passagem e propagação das células.

A invenção proporciona assim métodos para o cultivo de uma cultura de células confluentes compreendendo os passos de crescimento de células dependentes da superfície num meio

basal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja. As células são criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja numa concentração de 0,05% (p/v) a 1,0% (p/v) e hidrolisado de levedura numa concentração de 0,05% (p/v) a 0,3% (p/v). De acordo com este aspeto da invenção, as células são criadas de biomassa de pequena escala para grande escala em meios isentos de proteína animal da invenção. A passagem e subcultura das células para obter uma biomassa de cultura celular são realizadas com uma protease não derivada de animais, tal como Pronase ou uma fração purificada desta. Uma protease é a fração semelhante a tripsina purificada de *Streptomyces griseus* (SGT) tal como descrito no pedido U.S. no. de série 10/006223. Para evitar material derivado de animais durante o cultivo de uma cultura de células, em particular durante o cultivo de células aderentes que crescem presas a um transportador, o transportador é de preferência um transportador sintético, ou um microtransportador revestido com um material não derivado de animais. Por exemplo, um microtransportador DEAE-dextrano ou dextrano revestido com amina quaternária.

A invenção proporciona também um processo de cultura de células isento de proteína animal, em que as células dependentes de superfície são cultivadas, subcultivadas e passadas sob condições desprovidas de proteínas animais. O processo compreendendo os passos de proporcionar um meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, crescimento de células no referido meio, passagem e subcultura das referidas células criadas nesse meio utilizando uma protease não derivada de animais, continuando a criar as células subcultivadas para alcançar uma densidade de células confluentes e repetindo os passos de subcultura e crescimento de células até que

seja alcançada a desejada biomassa final da cultura de células. O processo inclui o crescimento das células em meio isento de proteína animal, subcultura e passagem das células utilizando uma protease não derivada de animais, de preferência uma fração semelhante a tripsina purificada de *Streptomyces griseus* (SGT). Durante a cultura de células aderentes que crescem ligadas a um transportador, o transportador é de preferência um transportador sintético, ou um microtransportador revestido com um material não derivado de animais. Através da combinação destes passos a utilização de proteínas animais pode ser evitada.

Células adequadas para crescimento nos meios isentos de proteína animal da presente invenção incluem, mas não se limitam a, células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células TCMK-1, células LLC-PK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células RK, células BHK-21, células WI-38, células 293 e/ou células MRC-5. Estas células podem ser infectadas com vírus, tais como um ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus, adenovírus e outros vírus conhecidos pelos peritos. Mais especificamente, o vírus utilizado para infectar a cultura celular pode ser vírus influenza, vírus vacínia e da varíola, vírus da varíola das aves, vírus da varíola bovina, vírus da encefalite transmitida por carraças (TBE), poliovírus, Vírus da Hepatite A, Vírus de Ross River, vírus da febre-amarela e um vírus quimérico derivado destes, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite japonesa, vírus da rubéola, vírus da hepatite C (HCV), vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus herpes simplex (HSV), citomegalovírus (CMV),

vírus de Epstein-Barr (EBV), rotavírus, vírus da febre aftosa (FMDV). Está dentro do conhecimento do perito na técnica selecionar o vírus e as células nas quais o vírus pode ser propagado. As células podem ser cultivadas no meio da invenção e criadas até atingirem uma densidade celular ótima antes da infecção com o respectivo vírus. Surpreendentemente, uma cultura de células criadas e propagadas num meio isento de proteína animal da invenção apresenta um aumento significativo da produtividade do vírus produzido. Exemplos de diferentes vírus propagados em células cultivadas e criadas no meio da invenção mostraram um aumento de 2 a 5 vezes do rendimento do vírus em comparação com um meio compreendendo unicamente extrato de levedura. Isto torna o sistema mais favorável para processos de crescimento celular e de produção de vírus que os descritos na técnica anterior.

De acordo com uma concretização da invenção, as células são células VERO e o vírus é selecionado a partir do grupo de Vírus Influenza, Vírus de TBE, vírus vacínia, poliovírus, Vírus de Hepatite A, Vírus de Ross River, vírus da febre-amarela e um vírus quimérico derivado deste, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite japonesa, vírus da rubéola, HCV, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório, HSV, CMV, EBV, rotavírus. Outros vírus que se sabe crescerem em células VERO podem também ser utilizados.

É aqui descrita a produção de vírus vacínia proporcionando uma cultura de células criadas e cultivadas num meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, infectando as referidas células com um vírus vacínia e incubando a cultura de células para propagar o vírus vacínia. De preferência, as células são



criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1,0% (p/v) e concentração de hidrolisado de levedura de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). De acordo com este aspeto do invento, as células podem ser células VERO, células CV-1, células RK, células BHK-21, células MRC-5, ou qualquer célula em que o vírus vacínia possa ser criado. O vírus vacínia pode ser um vírus vacínia de ocorrência natural, a estirpe de vacina do vírus da varíola, estirpes virulentas de vacínia, estirpes atenuadas de vacínia e um vírus vacínia recombinante.

É aqui descrita a produção de ortomixovírus proporcionando uma cultura de células cultivadas e criadas num meio isento de proteína animal feita a partir de um meio basal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, infectando as células com um ortomixovírus e incubando a cultura de células para propagar o ortomixovírus. De preferência, as células são criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1,0% (p/v) e hidrolisado de levedura na concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). As células podem ser células BSC-1, células CV-1, células VERO, células MDBK, células MDCK, células MDOK, células BHK-21, células WI-38, células MRC-5 ou qualquer célula na qual o ortomixovírus possa ser propagado. O ortomixovírus pode ser um vírus influenza, tal como Influenza A, B ou C.

É aqui descrita a produção de Vírus de Ross River proporcionando uma cultura de células criadas e cultivadas num meio isento de proteína animal feito a partir de um meio basal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, infectando as referidas células com um

Vírus de Ross River e incubando a cultura de células para propagar o Vírus de Ross River. De preferência, as células são criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja a uma concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1,0% (p/v) e hidrolisado de levedura a uma concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). As células podem ser células BSC-1, células CV-1, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células BHK-21, células WI-38, células MRC-5 ou qualquer célula na qual o Vírus de Ross River possa ser propagado.

Adicionalmente, é aqui descrita a produção de Flavivírus proporcionando uma cultura de células criadas e cultivadas num meio isento de proteína animal feito a partir de um meio basal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, infectando as células com um Flavivírus e incubando a cultura de células para propagar o Flavivírus. De preferência, as células são criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1,0% (p/v) e hidrolisado de levedura numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). O Flavivírus pode ser um vírus da febre-amarela, ou um vírus recombinante ou derivados quiméricos deste, vírus da encefalite japonesa, Vírus da encefalite transmitida por carraças, Vírus do Nilo Ocidental, e vírus da Hepatite C. Os tipos celulares aqui identificados podem ser utilizados para a propagação de flavivírus.

É aqui descrita a produção de Picornavírus proporcionando uma cultura de células criadas e cultivadas num meio isento de proteína animal feito a partir de um meio basal compreendendo hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, infectando as células com um Picornavírus e incubando

a cultura de células para propagar o Picornavírus. De preferência, as células são criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 1,0% (p/v) e hidrolisado de levedura numa concentração de cerca de 0,05% (p/v) a cerca de 0,3% (p/v). O Picornavírus pode ser um poliovírus ou vírus de hepatite A. Os tipos celulares aqui identificados podem ser utilizados para a propagação de Picornavírus.

São aqui descritos métodos de produção de composições imunogénicas compreendendo um vírus ou um antígeno viral compreendendo os passos de proporcionar uma cultura de células animais, em que as células são selecionadas a partir do grupo de células de rim de macaco, células de rim bovino, células de rim de cão, células de rim de porco, células de rim de ratinho, células de rim de rato, células de rim de ovelha, células de rim de coelho, células de rim de hamster e células humanas que tenham sido criadas num meio da invenção; infecção das células com um vírus selecionado a partir do grupo de ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus e adenovírus, incubação da cultura de células para propagar o vírus, colheita do vírus produzido e preparação de uma composição imunogénica a partir do vírus colhido. O vírus produzido e colhido pode ser purificado com um método conhecido na técnica, tal como permuta iónica ou filtração em gel.

Tendo agora descrito geralmente esta invenção, a mesma será melhor compreendida por referência aos exemplos seguintes que são aqui fornecidos para fins de ilustração e não são de modo algum limitativos.

**EXEMPLOS:**

## EXEMPLO 1

**Formulação do meio de cultura**

O meio isento de proteína animal é preparado com um meio basal DMEM/F12 de HAM (1:1), que é suplementado com sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros componentes. São também adicionados bicarbonato de sódio (1-3 g/L), L-glutamina (0,1 a 1 g/L) e concentrações variáveis de hidrolisado de soja (Quest Technologies, New York) ou hidrolisado de levedura (Deutsche Hefewerke, Alemanha) ou combinações destes.

## EXEMPLO 2

**Propagação de células em meio isento de proteína animal****Células VERO em meio isento de proteína animal**

Células VERO (Macaco Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*, rim) foram utilizadas como linha celular. As células foram obtidas a partir da American Type Cell Culture Collection, Rockville, Maryland, a um número de passagens de 124, com a designação ATCC CCL 81. As células foram criadas em diferentes meios, tal como aqui descrito.

As células do banco de células de trabalho foram expandidas em balões T e garrafas rolantes e sistemas microtransportadores, com uma relação de divisão de 1:6-1:8. As células foram criadas a 37°C durante 6-8 dias. As condições de cultura de saturação de oxigénio de 20%±10% e pH 7,1±0,35 foram mantidas constantes. No final da produção de biomassa quando as células atingiram a confluência de

crescimento, foi determinada a densidade celular e a taxa de consumo de oxigênio.

O número de células da biomassa da cultura celular no final da produção de biomassa foi determinado quer por tripsinização das células e contagem com um contador de células CASY® (método A) tal como descrito por Schärfe *et al.* *Biotechnologie in LaborPraxis* 10: 1096-1103 1988) ou através de tratamento com ácido cítrico e violeta cristal seguido de contagem com um hemocitómetro (método B) tal como descrito por Sanford *et al.*, *J. Nat'l Cancer Inst.* 11: 773-795 (1951).

Células VERO foram cultivadas e criadas em meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de levedura numa concentração de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% ou 0,4%, 0,5% (p/v), ou hidrolisado de soja numa concentração de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% ou 0,4%, 0,5% (p/v), ou hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura numa concentração de levedura para soja de (levedura/soja) de 0,05%/0,05% (p/v), 0,1%/0,2% (p/v), 0,1%/0,3% (p/v), 0,2%/0,2% (p/v), 0,3%/0,2% (p/v) ou 0,2%/1,0% (p/v). A densidade celular da cultura de células no final da produção de biomassa, em meio isento de proteína animal compreendendo várias concentrações de hidrolisado de soja, hidrolisado de levedura, ou combinações destes foi calculada através dos métodos A e B.

Os resultados demonstram que o hidrolisado de levedura e de soja sozinho suportou o crescimento celular. A uma concentração de 0,1% de hidrolisado de levedura foi alcançada uma densidade celular de cerca de  $11,8 \times 10^5$  células/ml, no entanto o aumento da concentração de

hidrolisado de levedura para mais de 0,3% (p/v) teve um efeito negativo no crescimento celular e consequentemente na densidade celular. Concentrações de hidrolisado de soja sozinho entre 0,1% (p/v) a 0,2% (p/v) mostraram menos crescimento celular e densidade celular que com concentrações de soja de 0,3% (p/v) e 0,4% (p/v). Contudo, a densidade celular e o consumo de oxigénio das células cultivadas em meio compreendendo 0,3% (p/v) ou 0,4% (p/v) de hidrolisado de soja não diferiram significativamente e concentrações superiores a cerca de 1% p/v de hidrolisado de soja não tiveram qualquer efeito positivo no crescimento celular. A concentração ótima de hidrolisado de soja sozinho foi determinada como sendo de 0,2% p/v a 1,0% p/v. Através da suplementação do meio basal com uma combinação de hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura a densidade celular final atingida foi significativamente aumentada em comparação com um meio compreendendo unicamente hidrolisado de soja ou de levedura. A densidade celular atingida a uma concentração de 0,05% (p/v) de soja e 0,05% (p/v) de levedura foi de cerca de  $12,1 \times 10^5$  células/mL e tinha uma maior densidade celular na cultura de células em comparação com as células criadas em meio compreendendo apenas 0,1% (p/v) de hidrolisado de soja ( $10 \times 10^5$  células/mL) ou 0,1% (p/v) de hidrolisado de levedura ( $11,8 \times 10^5$  células/mL). A densidade celular de uma cultura de células criada num meio compreendendo levedura com uma concentração de 0,2% (p/v) e soja a 1,0% (p/v) foi semelhante à densidade obtida em meio compreendendo 0,05% (p/v) de soja e 0,05% de levedura (p/v).

O efeito mais significativo no crescimento celular foi no meio em que a concentração de hidrolisado de soja em comparação com o hidrolisado de levedura foi de cerca de 2-

3 vezes mais elevada. As células criadas num meio compreendendo hidrolisado de soja a uma concentração de cerca de 0,3% (p/v) e hidrolisado de levedura a cerca de 0,1% (p/v) atingiram uma densidade celular de cerca de  $21,0 \times 10^5$  células/mL e mostraram, portanto, uma densidade celular aproximadamente 2 vezes mais elevada em comparação com células criadas apenas em hidrolisado de soja a cerca de 0,4% (p/v) e uma densidade celular cerca de 2,5 vezes mais elevada em comparação com células cultivadas em meio compreendendo unicamente hidrolisado de levedura a cerca de 0,4% (p/v). A atividade metabólica de células cultivadas em meio contendo hidrolisado de levedura e de soja foi também maior em comparação com células cultivadas em meio compreendendo apenas hidrolisado de levedura ou de soja. A taxa de consumo de oxigénio foi de 1,5 (% por min) num meio compreendendo 0,1% (p/v) de hidrolisado de levedura e inferior a 1,0 (% por min) em meio contendo 0,4% (p/v) de hidrolisado de levedura ou de hidrolisado de soja sozinho. Num meio compreendendo 0,1% (p/v) de hidrolisado de levedura e 0,3% (p/v) de hidrolisado de soja o consumo de oxigénio foi de cerca de 2,9 (% por min), que foi cerca de 2 vezes superior ao das células cultivadas num meio compreendendo unicamente hidrolisado de soja ou de levedura.

Além disso, o ciclo celular, que é de 7 dias em meio isento de proteína animal suplementado com apenas hidrolisado de levedura ou de soja, é reduzido para 6 dias no meio de combinação de hidrolisados (soja e levedura).

### EXEMPLO 3

#### **Propagação de células recombinantes**

Uma cultura celular de células de mamífero recombinantes, tais como células rFVIII-CHO, são cultivadas num tanque de 10 L agitado com perfusão. Um meio de acordo com o Exemplo 1 é utilizado como meio de cultura e crescimento. As células são imobilizadas num microtransportador poroso (Cytopore®, Pharmacia) e cultivadas durante pelo menos 6 semanas. A taxa de perfusão é de 4 mudanças de volume por dia; o pH é de 6,9 a 7,2; a concentração de O<sub>2</sub> é de aproximadamente 20-50% e a temperatura é de 37°C. A densidade celular foi determinada.

#### EXEMPLO 4

##### **Comparação da produção de antigénio viral em células VERO criadas em meio suplementado com hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja**

###### **a. Produção de biomassa da cultura celular**

Células VERO com um número de passagens definido foram descongeladas a partir de azoto líquido e passadas em frascos de Roux e garrafas rolantes para produzir células suficientes para inocular um biorreator de 1,5 litros. As células são criadas em meio basal suplementado quer com hidrolisado de levedura, quer com uma combinação de hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja, tal como descrito nos Exemplos 1 e 2. Após atingir a confluência, com uma densidade celular final de  $1,5 \times 10^6$  células/mL, as células foram libertadas do microtransportador com uma fração purificada de Pronase, tripsina de *S. griseus* (SGT), tal como descrito no pedido U.S. no. de série 10/006223 e transferidas para um biorreator de 10 litros. Estas, por sua vez, foram utilizadas como inóculo para um biorreator de 100 litros possuindo uma concentração de microtransportador de 3,0 g/L. A partir de uma ampola do



banco de células de trabalho contendo  $10^7$  células, foram necessárias cerca de 30 gerações para atingir a biomassa final de células VERO confluentes no último vaso fermentador. As células foram criadas a 37°C. As condições de cultura de saturação de oxigénio de 20%±10% e pH 7,1±0,35 foram mantidas constantes durante o processo de propagação do vírus.

As células do banco de células de trabalho de células VERO foram expandidas em balões T e garrafas rolantes com uma razão de divisão de 1:6. Mais propagação das células foi realizada num fermentador agitado de 1,5, 10 e 50 L como biorreator utilizando o microtransportador Cytodex 1® como substrato de adesão. As células foram criadas a 37°C. As condições de cultura de saturação de oxigénio de 20%±10% e pH 7,1±0,35 foram mantidas constantes durante o processo de propagação do vírus.

#### **b. Propagação do Vírus Influenza**

Células Vero foram infetadas com duas estirpes diferentes de influenza, New Caledonia A/H1N1 e Panama A/H3N2, e propagadas no respetivo meio. No final do processo de propagação do vírus o sobrenadante clarificado contendo o vírus foi purificado através de ultracentrifugação. As colheitas da cultura de células VERO unicamente com hidrolisado de levedura ou com hidrolisado de levedura e de soja foram comparadas com base na produtividade volumétrica do antigénio (SRD total, imunodifusão radial simples) e no teor de antigénio do sobrenadante no final de cada ensaio (antigénio purificado em gradiente de densidade). Os rendimentos para ambas as formulações de meio foram comparados e são resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1.**

**Comparação do rendimento de produto a partir da produção de Influenza em VERO em diferentes composições de meio**

	SRD (µg/mL)	Proteína (µg/mL)	SRD/ Proteína	Dose/ Litro (por estirpe)
Estirpe	New Caledonia A/H1N1			
1 g/L de hidrolisado de levedura + 3 g/L de hidrolisado de soja	130	341	0,38	146
1 g/L de hidrolisado de levedura	51	147	0,35	57
Estirpe	Panama A/H3N2			
1 g/L de hidrolisado de levedura + 3 g/L de hidrolisado de soja	130	233	0,56	103
1 g/L de hidrolisado de levedura	44	117	0,38	35

A combinação de hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja mostra uma melhoria marcada em relação ao hidrolisado de levedura sozinho.

### **c. Produção de Poxvírus**

Células VERO foram infetadas com uma estirpe de produção da vacina da varíola (Dryvax, Wyeth Vaccines, obtida em Acambis, Inc., uma estirpe de vacina de linfa de vitelo adaptada para crescimento em linha celular permanente) adaptada a crescimento em células VERO isento de proteína animal através de passagens em série a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1-0,3. Após um tempo de incubação de 2-4 dias a 37°C as células foram colhidas e o vírus foi recuperado das células.

A Tabela 2 mostra os resultados do rendimento de vírus obtido de células criadas em meio basal suplementado com

hidrolisado de levedura sozinho ou com hidrolisado de levedura ou de soja.

**TABELA 2:**

**Determinação do título de vírus Vacínia no final do ciclo de produção no sistema biorreator.**

Suplemento do meio	moi	Título Final (pfu)	Pfu/Célula
1 g/L de hidrolisado de levedura	0,1-0,3	$1,42 \times 10^7$ /mL	14
1 g/L de hidrolisado de levedura + 3 g/L de hidrolisado de soja	0,1-0,3	$16,00 \times 10^7$ /mL	69

A combinação de hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja mostra uma marcada melhoria em relação ao hidrolisado de levedura sozinho.

#### **d. Produção de Vírus de Ross River**

A cultura de células VERO obtida tal como aqui descrito foi infectada com Vírus de Ross River a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1-0,3. Após um tempo de incubação de 2-4 dias a 37°C, as células foram colhidas e o vírus foi recuperado a partir das células. A Tabela 3 mostra os resultados do rendimento do vírus obtido a partir de células criadas em meio basal suplementado unicamente com hidrolisado de levedura ou com hidrolisado de levedura e de soja.

**TABELA 3**

**Determinação do título de Vírus de Ross River no final do ciclo de produção no sistema biorreator.**

<b>Suplemento do meio</b>	<b>Título Final (pfu/mL)</b>	<b>Rendimento Relativo (%)</b>
1 g/L de hidrolisado de levedura	$1,5 \times 10^7$	100
1 g/L de hidrolisado de levedura + 3 g/L de hidrolisado de soja	$2,5 \times 10^7$	167

A combinação de hidrolisado de levedura e hidrolisado de soja apresenta uma melhoria significativa em relação ao hidrolisado de levedura sozinho.

Deve-se entender-se que a descrição, os exemplos e dados específicos, embora indicando formas de realização exemplares, são dados para fins de ilustração e não se destinam a limitar a presente invenção.

Lisboa, 19 de Setembro de 2012

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de cultivo de uma cultura celular confluenta de células dependentes da superfície compreendendo:

proporcionar um meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja a uma concentração de 0,05% (p/v) a 1% (p/v) e hidrolisado de levedura a uma concentração de 0,05% (p/v) a 0,3% (p/v); e

propagação das células no meio para formar a cultura celular confluenta, e passagem e subcultura das células enquanto em contacto com uma protease não derivada de animais.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células são células animais selecionadas a partir do grupo consistindo em células de inseto, células de ave e células de mamífero.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células são células recombinantes.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células são selecionadas a partir do grupo de células consistindo em células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células TCMK-1, células LLC-PK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células NS-1, células MRC-5, células W1-38, células BHK, e células RK.

5. Método da reivindicação 4, em que as células são infectadas com um vírus.

6. Método da reivindicação 5, em que o vírus é selecionado a partir do grupo de ortomixovírus, paramixovírus, reovírus, Picornavírus, flavivírus, arenavírus, herpesvírus, poxvírus, coronavírus e adenovírus.

7. Método da reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que o referido vírus é selecionado a partir do grupo de vírus influenza, vírus vacínia e da varíola, vírus da varíola aviária, vírus da varíola bovina, vírus da encefalite transmitida por carraças (TBE), poliovírus, Vírus da Hepatite A, Vírus de Ross River, vírus da febre-amarela e um vírus quimérico derivado deste, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite japonesa, vírus da rubéola, vírus da hepatite C (HCV), vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus herpes simplex (HSV), citomegalovírus (CMV), vírus de Epstein-Barr (EBV), rotavírus e vírus da febre aftosa (FMDV).

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-7, em que as referidas células são células VERO e o referido vírus é selecionado a partir do grupo de Vírus Influenza, Vírus de TBE, vírus vacínia, poliovírus, Vírus de Hepatite A, Vírus de Ross River, vírus da febre-amarela e um vírus quimérico derivado deste, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite japonesa, vírus da rubéola, HCV, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório, HSV, CMV, EBV e rotavírus.

9. Processo de cultura de células confluentes isento de proteína animal, compreendendo:

proporcionar um meio isento de proteína animal compreendendo hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura;

crescimento de células dependentes da superfície no meio, e passagem e subcultura das células criadas no meio enquanto em contacto com uma protease não derivada de animais para obter uma cultura de células confluentes.

10. Utilização de um meio isento de proteína animal no cultivo de uma cultura celular confluyente de células dependentes da superfície, o meio compreendendo hidrolisado de soja a uma concentração de 0,05% (p/v) a 1% (p/v) e hidrolisado de levedura a uma concentração de 0,05% (p/v) a 0,3% (p/v).

11. Método, processo ou utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as células são criadas num transportador.

12. Método, processo ou utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o transportador é um transportador sintético ou um microtransportador revestido com um material não animal.

13. Método, processo ou utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o transportador é baseado em dextrano, colagénio, plástico, gelatina ou celulose.

14. Método, processo ou utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a protease é uma fração semelhante a tripsina purificada de *Streptomyces griseus* (SGT).

Lisboa, 19 de Setembro de 2012