

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 706**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2003 E 10010584 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2287288**

54 Título: **Medio exento de proteínas animales para el cultivo de células**

30 Prioridad:

**09.07.2002 US 394243 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.03.2013**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)**  
**One Baxter Parkway**  
**Deerfield, IL 60015, US y**  
**BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED;**  
**MUNDT, WOLFGANG;**  
**GRILLBERGER, LEOPOLD, DR. y**  
**KRAUS, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 398 706 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medio exento de proteínas animales para el cultivo de células .

### CAMPO DE LA INVENCION

5 En este documento se describe un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende una combinación de un hidrolizado de soja y un hidrolizado de levadura. La invención se refiere a procesos de cultivo exentos de proteínas animales, en los que las células pueden ser cultivadas, propagadas y pasadas sin proteínas animales. Estos procesos son útiles para cultivar células, tales como células infectadas con un virus, y para producir productos biológicos mediante procesos de cultivo celular.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Para el cultivo de células, particularmente de células eucariotas, y más específicamente de células de mamífero, existe una necesidad constante de usar medios de cultivo especiales que hagan disponibles las sustancias nutrientes y las sustancias nutrientes de crecimiento que son necesarias para un crecimiento eficaz de las células y para la producción de las proteínas o de los virus que se desean. Las formulaciones de medios de cultivos celulares se han  
15 complementado con diversos aditivos, que incluyen componentes indefinidos tales como suero bovino fetal (*fetal calf serum*, FCS), diversas proteínas derivadas de animales y/o hidrolizados de proteínas de origen bovino.

En general, el suero o las sustancias derivadas del suero, tales como la albúmina, la transferrina o la insulina, pueden contener agentes no deseados que pueden contaminar los cultivos y los productos biológicos obtenidos a partir de los mismos. Adicionalmente, los aditivos derivados de suero humano deben ser ensayados para comprobar todos los virus conocidos, incluyendo hepatitis y VIH, que pueden ser transmitidos por el suero. Además, el suero bovino y los  
20 productos derivados del mismo, por ejemplo, la tripsina, son portadores de un riesgo de contaminación por BSE. Además, todos los productos derivados de suero pueden estar contaminados por agentes desconocidos. En el caso del suero o de aditivos proteicos que derivan de seres humanos o de otras fuentes animales en cultivos celulares, existen numerosos problemas (por ejemplo, la calidad y la composición variables de los diferentes lotes y el riesgo de contaminación por agentes de micoplasma, virus o BSE), particularmente si las células se usan para la producción de  
25 agentes medicinales o de vacunas para su administración a seres humanos.

Por lo tanto, se han realizado muchos intentos para proporcionar sistemas hospedadores y condiciones de cultivo eficaces que no requieran suero ni otros compuestos proteicos animales. El medio simple exento de suero incluye típicamente medio basal, vitaminas, aminoácidos o sales orgánicas e inorgánicas, y quizás componentes  
30 adicionales para hacer el medio nutricionalmente complejo. Sin embargo, tales medios son a menudo insuficientes nutricionalmente y deben complementarse con complementos proteicos derivados de animales o versiones recombinantes de proteínas usadas en los cultivos celulares, tales como insulina, factor de crecimiento insulinoide u otros factores de crecimiento.

Para evitar el uso de complementos proteicos derivados de animales en medios de cultivo celulares exentos de suero, se han realizado muchos intentos para proporcionar medios de cultivo celulares que estén completamente  
35 exentos de proteínas.

Cinatl y col., *Cell Biology International* 17: 885 – 895 (1993) describen el desarrollo de un medio (PFK-1) específico para la propagación continua de células VERO en una superficie de cultivo de polivinilo formal (PVF).

En el documento WO 96/15231 se describe un medio exento de suero formado por un medio sintético mínimo esencial y extracto de levadura para la propagación de células de vertebrados y procesos de producción de virus.

40 En el documento WO 98/15614 se describe una formulación de medio compuesta por medio de un cultivo celular basal que comprende un péptido de arroz y un extracto de levadura o un digerido enzimático de los mismos, y/o un lípido vegetal para el crecimiento de células animales.

En el documento WO 01/23527 se describe un medio que comprende un hidrolizado de soja purificado para el cultivo de células recombinantes.

45 En el documento WO 00/03000 se describe un medio que comprende un hidrolizado de soja y un extracto de levadura, pero también requiere la presencia de formas recombinantes de proteínas animales, tales como factores de crecimiento.

Para una producción eficaz de los productos biológicos, tales como virus o proteínas recombinantes, es importante que se alcance una densidad celular óptima para obtener el máximo rendimiento del producto.

50 Por lo tanto, existe una necesidad actual de aumentar el crecimiento, la actividad metabólica y la densidad de las células, y de proporcionar un medio de cultivo celular óptimo desprovisto de proteínas animales para la producción de productos biológicos, tales como aquellos usados como medicinas o vacunas en seres humanos. Además, el procesamiento anterógrado, por ejemplo, la purificación del producto deseado a partir del medio de cultivo puede ser  
55 más eficaz en coste y tiempo si no hay proteínas animales presentes en el suero. Adicionalmente, las proteínas animales inmunógenas indeseadas pueden inducir reacciones inmunológicas perjudiciales, que se evitan con la práctica de la presente invención.

### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se establece en las reivindicaciones.

Un objeto de la presente descripción es proporcionar un medio de cultivo celular exento de proteínas animales. Para conseguir este y otros objetos, se proporciona un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura. El hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de al menos el 0,05 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de al menos 5 0,05 % (p/v). Opcionalmente, el hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de menos del 1,0 % (p/v) y el hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de menos del 0,3 % (p/v). Opcionalmente, el hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,2 % (p/v) a aproximadamente el 0,6 % (p/v) y el hidrolizado de levadura puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,2 % (p/v). Opcionalmente, el hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,25 % (p/v) a aproximadamente el 0,35 % (p/v) y el hidrolizado de levadura puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,15 % (p/v). Opcionalmente, el hidrolizado de soja puede estar presente en una concentración de aproximadamente el 0,3 % (p/v) y el hidrolizado de levadura puede estar presente en una concentración de aproximadamente el 0,1 % (p/v). Opcionalmente, el medio comprende 3 partes en peso de hidrolizado de soja por 1 parte en peso de hidrolizado de levadura. El hidrolizado de levadura puede ser un hidrolizado de levadura ultrafiltrado purificado, en el que al menos el 40 % de dicho hidrolizado de levadura tiene un peso molecular menor o igual a 500 Dalton. De forma similar, el hidrolizado de soja puede ser un hidrolizado de soja ultrafiltrado purificado, en el que al menos el 40 % de dicho hidrolizado de soja tiene un peso molecular menor o igual a 500 Dalton.

La invención también proporciona procedimientos para cultivar cultivos de células que comprenden proporcionar un medio que comprende hidrolizado de soja a una concentración de aproximadamente 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v); y propagar las células en el medio para formar el cultivo celular. También pueden emplearse otras concentraciones de hidrolizados, como se ejemplificó anteriormente. Las células pueden ser células animales, tales como células de insecto, células de ave, células de mamífero, células madre, y preferiblemente aquellas células que se usan para la producción de virus *in vitro*. Las células también pueden ser células recombinantes. Algunos ejemplos de células incluyen aquellas elegidas del grupo de células formado por 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 y células RK.

En este documento se describe también un proceso de cultivo de células confluentes exento de proteínas animales que comprende: proporcionar un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; hacer crecer las células en el medio, y pasar y subcultivar las células que han crecido en el medio mientras están en contacto con una proteasa no derivada de animales con objeto de obtener un cultivo de células confluentes. Las células pueden ser células animales, células recombinantes y/o células infectadas por un virus. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

Además, en este documento se describe un cultivo de células cultivadas en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja a una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a el aproximadamente el 0,3 % (p/v). Según la invención también pueden emplearse otras concentraciones de hidrolizados, como se ha ejemplificado anteriormente. Las células pueden ser células animales, células recombinantes y/o células infectadas por un virus. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

Adicionalmente, la invención proporciona procedimientos para producir virus que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja y un hidrolizado de levadura; infectar las células con un virus; e incubar las células infectadas para propagar el virus. Las células pueden ser células animales y/o células recombinantes, y en particular, células de mamífero. Las características de los medios y de los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también. Los virus que se van a producir en las células cultivadas se pueden elegir de una serie de virus conocidos por infectar el tipo celular cultivado. Por ejemplo, cuando se utiliza un cultivo de células de mamífero, los virus se pueden elegir de entre los géneros ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus y adenovirus. El virus usado puede ser un virus natural, un virus atenuado, un virus reagrupado o un virus recombinante. Además, en lugar de los actuales viriones usados para infectar las células con un virus, se puede utilizar un clon de un ácido nucleico infeccioso según los procedimientos de transfección de clones conocidos por los expertos en el campo de la virología.

La invención proporciona adicionalmente procedimientos para producir poxvirus (incluido virus vaccinia), que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con poxvirus; e incubar las células infectadas para propagar el poxvirus. Las células pueden ser células de mamífero y/o células recombinantes. Las características de los medios y de los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

Además, la invención proporciona adicionalmente procedimientos para producir coronavirus (incluido el coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo), que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con coronavirus; e incubar las células infectadas para propagar el coronavirus. Las células pueden ser células de mamífero y/o células recombinantes. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

Además, la invención proporciona procedimientos para producir ortomixovirus, que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con ortomixovirus; e incubar las células infectadas para propagar el ortomixovirus. El ortomixovirus puede ser virus de la gripe A, B o C. Las células pueden ser células de mamífero y/o células

recombinantes. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

5 La invención proporciona adicionalmente procedimientos para producir virus de Ross-River, que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con virus de Ross-River; e incubar las células infectadas para propagar el virus de Ross-River. Las células pueden ser células de mamífero y/o células recombinantes. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

10 La invención también proporciona procedimientos para producir flavivirus, que comprenden: hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con el flavivirus; e incubar las células infectadas para propagar el flavivirus. El flavivirus se puede elegir del grupo formado por virus de la fiebre amarilla, y virus quiméricos derivados del mismo, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo occidental y virus de la hepatitis C. Las células pueden ser células animales y/o células recombinantes. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

15 La invención proporciona adicionalmente procedimientos para producir composiciones inmunógenas que comprenden un virus o antígenos de un virus, en los que el procedimiento comprende hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura; infectar las células con el virus; incubar las células infectadas para propagar el virus; recoger el virus o el antígeno del virus producido; preparar una composición inmunógena a partir del antígeno del virus o del antígeno del virus recogido. Las células pueden ser células animales y/o células recombinantes. Las características de los medios y los tipos celulares expuestos en este documento se pueden aplicar aquí también.

20 La invención también proporciona procedimientos para producir composiciones inmunógenas que comprenden un virus o un antígeno de un virus, en los que el procedimiento comprende hacer crecer un cultivo de células de mamífero, en el que las células se seleccionan del grupo formado por células renales de mono, células renales de bovino, células renales de perro, células renales de cerdo, células renales de ratón, células renales de rata, células renales de oveja, células renales de hámster y células humanas, en un medio de cultivo exento de proteínas animales que comprende un hidrolizado de soja y un hidrolizado de levadura; infectar las células con un virus elegido del grupo formado por ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus y adenovirus; incubar el cultivo de células para propagar el virus; recoger el virus o el antígeno del virus así producido; y preparar una composición inmunógena a partir del virus o el antígeno del virus recogido.

25 Adicionalmente, se describen en este documento cultivos de células infectadas por ortomixovirus, poxvirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus o adenovirus, en los que las células se cultivan en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura. El hidrolizado de soja puede estar en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) y el hidrolizado de levadura puede estar a una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). Según la invención también pueden emplearse otras concentraciones de hidrolizados, como se ejemplificó anteriormente.

30 Adicionalmente se describen en este documento preparaciones de ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus o adenovirus que están exentas de proteínas animales, incluyendo versiones producidas recombinantemente de los mismos, a partir del medio, en el que la preparación se obtiene mediante el cultivo de células infectadas con virus de la gripe en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura. El hidrolizado de soja puede estar en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) y el hidrolizado de levadura puede estar en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). También pueden emplearse otras concentraciones de hidrolizados, como se ejemplificó anteriormente. Estas preparaciones víricas son adecuadas para su uso en la elaboración de antígenos víricos y vacunas tras un procesamiento adicional.

35 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para la persona experta vista la explicación y los datos expuestos a continuación.

50

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se establece en las reivindicaciones.

55 El término "medio exento de proteínas animales", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a un medio que no está complementado con proteínas ni componentes proteicos procedentes de eucariotas superiores pluricelulares no vegetales (esto es, vertebrados), que poseen las características de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas según aparecen en la naturaleza. Las proteínas típicas que se evitan son aquellas que se encuentran en el suero y en las sustancias derivadas del suero, tales como albúmina, transferrina, insulina y otros factores de crecimiento. Las versiones producidas recombinantemente de proteínas animales, que pueden contener componentes bacterianos inmunógenos, también son evitadas según la invención, y no están presentes en el medio exento de proteínas animales descrito en este documento. Las proteínas animales y los componentes proteicos deben distinguirse de las proteínas no animales, pequeños polipéptidos y oligopéptidos obtenidos a partir de vegetales (habitualmente de aproximadamente 10 – 30 aminoácidos de longitud), tales como la semilla de soja, y de eucariotas inferiores, tales como la levadura. Por supuesto, una vez que el medio se pone en contacto o se inocula en las células que se van a propagar, el medio contendrá proteínas animales desprendidas o secretadas por esas células, incluyendo

60

5 cualquier proteína recombinante expresada por las células modificadas genéticamente si se cultivan dichas células. Por lo tanto, el término medio exento de proteínas animales, y los materiales y preparaciones biológicas producidos con ellos, no debe interpretarse como que requieren la ausencia de las proteínas desprendidas o secretadas por las células propagadas en el medio, sino que más bien se refiere a la ausencia de una complementación directa del medio con proteínas y componentes proteicos animales obtenidos a partir de fuentes animales o similares producidos recombinantemente.

10 El término "medio basal", en sus diversas formas gramaticales, es un medio sintético, tal como DMEM, HAMBs F12, Medio 199 o RPMI, o combinaciones de los mismos, y otros que son conocidos a partir de la bibliografía o que están disponibles comercialmente. Según la invención, cualquier medio sintético que no contenga proteínas animales puede usarse en combinación con la combinación de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura. El medio basal puede comprender varios ingredientes, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas fuentes de carbohidratos, estando presente cada ingrediente en una cantidad que sustente el cultivo de una célula *in vitro*. Por ejemplo, puede usarse el medio DMEM/HAM's F12 (1:1) como medio basal. El medio puede contener sustancias auxiliares, tales como sustancias tamponantes como bicarbonato sódico, estabilizantes de la oxidación, estabilizantes para contrarrestar el estrés mecánico, o inhibidores de la proteasa. Si se requiere puede añadirse al medio como agente antiespumante un tensioactivo no iónico, tal como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108). Estos agentes se usan generalmente para proteger las células de los efectos negativos de la aireación, dado que, sin la adición de un tensioactivo, las burbujas de aire que ascienden y explotan pueden producir daños en aquellas células que están ubicadas en la superficie de estas burbujas de aire ("burbujeo (*sparging*)"). La cantidad de tensioactivo no iónico está preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 10 g/L, típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 g/L. Además, el medio también puede contener ciclodextrina o derivados de la misma, típicamente entre aproximadamente 0,001 g/L y aproximadamente 1 g/L.

25 Según la invención, el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura, que pueden añadirse a un medio basal. El término "hidrolizado" incluye un digerido enzimático de peptona de soja o de extracto de levadura. El hidrolizado puede obtenerse a partir de una pluralidad de preparaciones de peptona de soja o de extracto de levadura, respectivamente, que pueden ser digeridos adicionalmente enzimáticamente (por ejemplo, con papaína) y/o formados mediante autólisis, termólisis y/o plasmólisis. Los hidrolizados también pueden obtenerse comercialmente, tales como Hy-Soy, Hy-Yeast 412 y Hi-Yeast 444, de fuentes tales como Quest International, Norwich, Nueva York, OrganoTechnie, S.A. Francia; Deutsche Hefewerke GmbH, Alemania. Algunas fuentes de extractos de levadura también se describen en el documento WO 98/15614. Algunas fuentes de extractos de levadura y de hidrolizados de soja también se describen en el documento WO 00/03000.

35 Los hidrolizados usados en el medio descrito en este documento se purifican preferiblemente a partir de la fracción en bruto, ya que las impurezas que podrían interferir con un cultivo eficaz se eliminan preferiblemente durante esta purificación, mejorando así la consistencia del hidrolizado. La purificación puede realizarse mediante ultrafiltración o con cromatografía de Sephadex, por ejemplo, con Sephadex G25 o Sephadex G10 o materiales equivalentes, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía en fase inversa. Estos procesos son conocidos en la materia. Usando estos procedimientos, pueden elegirse fracciones que contienen hidrolizado de soja o de levadura con un peso molecular definido, preferiblemente  $\leq 1.000$  Dalton, más preferiblemente  $\leq 500$  Dalton, aún más preferiblemente  $\leq 350$  Dalton. Al menos el 90 % del hidrolizado tiene preferiblemente un peso molecular de  $\leq 1.000$  Dalton. El peso molecular medio de los hidrolizados de soja y de levadura está preferiblemente entre aproximadamente 220 y 375 Daltons. El valor del pH del hidrolizado de soja y del hidrolizado de levadura debería estar en el intervalo de aproximadamente 6,5 y 7,5. El contenido total en nitrógeno debería estar entre aproximadamente el 8 y el 11 %, preferiblemente de entre el 9,0 y el 10,0 %, y el contenido en cenizas  $\leq 18$  %. Un hidrolizado ventajoso se caracteriza por la característica de que tiene un contenido en aminoácidos libres de entre aproximadamente el 5 y el 30 %. El contenido en endotoxinas, si las hubiera, debería ser  $< 500$  U/g.

50 Un medio descrito en este documento tiene la siguiente circunscripción: medio mínimo sintético (medio DMEM/HAM's F12 (1:1) (1 – 25 g/L), hidrolizado de soja (0,5 – 10 g/L) e hidrolizado de levadura (0,5 – 3 g/L), L-glutamina (0,05 – 1 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (0,1 – 10 g/L). El pH del medio está entre pH 6,8 y 7,6, preferiblemente entre pH 7,0 y 7,3.

55 Como es evidente para la persona experta, el término "aproximadamente" en el contexto de valores numéricos o intervalos se refiere a valores o intervalos que se aproximan o son cercanos a los valores o intervalos mencionados, de forma que la invención puede realizarse como se pretende, tal como promoviendo un grado deseado de crecimiento celular, como resulta evidente a partir de las enseñanzas contenidas en este documento, y se aplica a todos los valores. Por lo tanto, este término engloba valores más allá de los resultantes de un error sistemático.

60 Sorprendentemente se ha averiguado que un medio basal exento de proteínas animales complementado con hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja en el intervalo según la presente descripción es más favorable para la tasa de crecimiento celular, la actividad metabólica celular y la densidad celular final en comparación con los medios descritos en la técnica anterior. Esto fue incluso más sorprendente en vista de las enseñanzas del documento WO 98/15614 que mostraba que concentraciones mayores de péptidos vegetales son menos óptimas. Con un medio exento de proteínas animales descrito en este documento que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja según se describe en este documento, las células mostraron una mayor tasa de crecimiento, una mayor densidad celular final de la biomasa y un incremento en la actividad metabólica (expresado en consumo de oxígeno en % por min) en comparación con un medio que comprende sólo hidrolizado de soja o hidrolizado de levadura, incluso si la concentración final del hidrolizado de levadura o del hidrolizado de soja añadido individualmente al medio es equivalente a la suma de la concentración de los hidrolizados combinados. Por ejemplo, a una concentración final de aproximadamente el 0,4 % (p/v) de hidrolizado de levadura solo en el medio tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular y la densidad celular. Un medio que comprende un 0,4 % (p/v) o concentraciones mayores de hidrolizado de soja no alcanzó una densidad celular mayor que un medio que comprende un 0,3 % (p/v). Sin embargo,

un medio que comprende una combinación de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura en una concentración final total de hidrolizado del 0,4 % (p/v) mostró un incremento significativo en la actividad metabólica celular, el crecimiento celular y la densidad celular final.

5 Según la invención, la suma de la cantidad del hidrolizado de soja y de levadura en el medio debería estar entre aproximadamente el 0,2 % (p/v) y aproximadamente el 0,6 % (p/v), con una proporción mayor de hidrolizado de soja en el medio en comparación con el hidrolizado de levadura. Una proporción óptima entre el hidrolizado de soja y de levadura debería ser de aproximadamente 3:1 (soja/levadura), respectivamente.

10 El medio según se describe en este documento es útil, en particular, para cultivar células. El término "células" puede significar un término genérico y engloba el cultivo de células individuales, tejidos, órganos, células de insecto, células de ave, células de mamífero, células primarias, líneas celulares continuas, células madre y/o células modificadas genéticamente, tales como células recombinantes que expresan un polipéptido o una proteína heteróloga. Algunas células recombinantes incluyen, por ejemplo, células CHO o células BHK que expresan polipéptidos o proteínas heterólogas, tales como un factor de crecimiento o un factor sanguíneo. Las células usadas a menudo para la propagación de virus incluyen células VERO y células CV-1.

15 Las células de mamífero adecuadas para su cultivo en el medio de cultivo celular descrito en este documento incluyen aquellas de origen humano, que pueden ser células primarias derivadas de una muestra tisular, cepas celulares diploides, células transformadas o líneas celulares establecidas. Las células de mamífero pueden incluir células humanas y células no humanas por igual. Las células de mamífero de origen no humano pueden ser células renales de mono, células renales de bovino, células renales de perro, células renales de cerdo, células renales de conejo, células renales de ratón, células renales de rata, células renales de oveja, células renales de hámster, células ováricas de hámster chino o una célula animal derivada de cualquier tejido. En particular, las células de mamífero que pueden cultivarse en el medio de cultivo pueden 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 y células RK. Algunos ejemplos de células recombinantes incluyen células CHO que expresan el Factor VIII, FII, FIX, FX, vWF, por ejemplo, todas las cuales son conocidas por la persona experta en la materia.

20 Los términos "células continuas" o "línea celular continua" (*continuous cell line*, CCL), en sus diversas formas gramaticales, significan células cultivadas que se replican indefinidamente y son capaces de crecer en un cultivo en suspensión o en un cultivo a gran escala en un biorreactor. El crecimiento sin restricciones de las CCL permite un cultivo a largo plazo a partir de un sustrato celular estandarizado y disminuye los costes. Las líneas celulares de mamífero pueden elegirse del 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 renales de conejo (*rabbit kidney*, RK) y otras líneas celulares según describen Butler y col., BIOS Scientific Publisher págs. 1 – 24 (1992). Las CCL se ensayan preferiblemente para comprobar la ausencia de agentes adventicios, tales como bacterias, hongos, micoplasma, protozoos y virus.

30 El término "cultivo celular", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a células crecidas en suspensión, en frascos rotatorios, matraces y similares. También están incluidas las metodologías a gran escala, tales como los biorreactores, incluyendo las células adherentes que crecen fijadas a microportadores en fermentadores agitados. Además, es posible no sólo cultivar células dependientes de la superficie, sino también usar las técnicas de cultivo en suspensión con el medio inventivo. Si las células se hacen crecer sobre microportadores, el microportador puede elegirse del grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros según se describe en Butler, Spier & Griffiths, *Animal cell Biotechnology* 3: 283 – 303 (1988). Son adecuados los portadores porosos, tales como, por ejemplo Cytoline® o Cytopore®, así como portadores basados en dextrano, tales como DEAE-dextrano (Cytodex 1®), dextrano recubierto con aminas cuaternarias (Cytodex 2®) o portadores basados en gelatina, tales como dextrano recubierto con gelatina (Cytodex 3®). Estos portadores pueden obtenerse en Pharmacia.

40 Las células se hacen crecer preferiblemente desde la ampolla a la biomasa en el medio exento de proteínas animales, y se mantienen en las condiciones del medio de cultivo durante el crecimiento del cultivo celular y el proceso de producción del producto. Preferiblemente se usan células que ya han sido adaptadas al medio. Se encontró que no sólo se conseguía un aumento en el rendimiento con dichas células preadaptadas, sino que su estabilidad para el cultivo también está claramente mejorada mediante el uso del medio según la invención.

50 El término "cultivo", en sus diversas formas gramaticales, se refiere al mantenimiento de las células *in vitro* en unas condiciones permisivas para el crecimiento y la viabilidad continuos. Las células de mamífero se cultivan típicamente en un incubador celular aproximadamente a 37 °C, teniendo el medio de cultivo un pH óptimo en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 7,6, preferiblemente entre 7,0 y 7,3. Las células en cultivo discontinuo podrían tener un cambio completo del medio cada 2 o 3 días, o más o menos frecuentemente, si fuera necesario. Las células de un cultivo por perfusión (por ejemplo, en un biorreactor o un fermentador) podrían tener un cambio de medio nuevo sobre una base de recirculación continua. Las metodologías de cultivo pueden incluir, dependiendo del contexto y de las necesidades, el subcultivo, los pases y la propagación de las células.

60 La invención proporciona por tanto procedimientos para cultivar un cultivo celular confluyente que comprenden las etapas de hacer crecer células en un medio basal que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja. Las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración del 0,05 % (p/v) al 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración del 0,05 % (p/v) al 0,3 % (p/v). Las células pueden hacerse hacer crecer desde pequeña escala hasta una biomasa a gran escala en el medio exento de proteínas animales descrito en este documento. Los pases y el subcultivo de las células para obtener una biomasa de cultivo celular se realizan preferiblemente con una proteasa no derivada de animales, tales como pronasa o una fracción purificada de la misma. Una proteasa es la fracción purificada de tipo tripsina de *Streptomyces griseus* (SGT) según se describe en la solicitud

de EE.UU. con número de serie 10/006.223. Para evitar el material derivado de animales durante el cultivo de un cultivo celular, en particular durante el cultivo de células adherentes que crecen fijadas a un portador, el portador es preferiblemente un portador sintético o un microportador recubierto con un material no derivado de animales. Por ejemplo, un microportador de DEAE-dextrano o de dextrano recubierto con una amina cuaternaria.

5 En este documento también se describe un proceso para el cultivo celular exento de proteínas animales, en el que las células se cultivan, se subcultivan y se pasan en unas condiciones desprovistas de proteínas animales. El proceso comprende las etapas de proporcionar un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, hacer crecer las células en dicho medio, pasar y subcultivar dichas células crecidas en ese medio usando una proteasa no derivada de animales, hacer crecer adicionalmente las células subcultivadas hasta 10 alcanzar una densidad celular confluyente y repetir las etapas de subcultivo y crecimiento de las células hasta que se alcance la biomasa de cultivo celular final. El proceso incluye el crecimiento de las células en un medio exento de proteínas animales, el subcultivo y el paso de las células usando una proteasa no derivada de animales, preferiblemente una fracción purificada de tipo tripsina de *Streptomyces griseus* (SGT). Durante el cultivo de las células adherentes que crecen fijadas a un portador, el portador es preferiblemente un portador sintético o un microportador recubierto con un 15 material no derivado de animales. Mediante la combinación de estas etapas puede evitarse el uso de proteínas animales.

Las células adecuadas para el crecimiento en el medio exento de proteínas animales descrito en este documento incluyen, pero no se limitan a, células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células VERO, células MDBK, 20 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 y/o células MRC-5. Estas células pueden ser infectadas por virus, tales como un ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus, adenovirus y otros virus conocidos por la persona experta. Más específicamente, el virus usado para infectar el cultivo celular puede ser virus de la gripe, virus de vaccinia y de la viruela, virus de la viruela aviar, virus de la viruela vacuna, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (*tick-borne encephalitis*, TBE), virus de la polio, 25 virus de la hepatitis A, virus de Ross River, virus de la fiebre amarilla y un virus quimérico derivado del mismo, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubéola, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial (*respiratory syncytial virus*, RSV), virus del herpes simple (*herpes simplex virus*, HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), rotavirus, virus de la glosopeda (*foot and mouth disease virus*, FMDV). En el conocimiento del experto en la materia está la selección del virus y de las células en las que se va propagar el virus. Las células pueden cultivarse en el medio descrito en este documento y hacerse crecer hasta alcanzar una densidad celular óptima antes de la infección con el respectivo virus. Sorprendentemente, un cultivo celular crecido y propagado en un medio exento de proteínas animales descrito en este documento muestra un incremento significativo en el rendimiento de la productividad del virus. Algunos ejemplos de diferentes virus propagados en células cultivadas y crecidas en el medio descrito en este documento han mostrado un incremento de 2 a 5 veces en el 30 rendimiento del virus en comparación con un medio que comprende únicamente extracto de levadura. Esto hace que el sistema sea más favorable para los procesos de crecimiento celular y de producción de virus que los descritos en la técnica anterior.

Según una forma de realización de la invención, las células son células VERO y el virus se selecciona del grupo de virus de la gripe, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), virus de vaccinia, virus de la polio, 40 virus de la hepatitis A, virus de Ross River, virus de la fiebre amarilla y un virus quimérico derivado del mismo, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubéola, HCV, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, HSV, CMV, EBV, rotavirus. También pueden usarse otros virus conocidos por crecer en células VERO.

La invención también proporciona la producción del virus de vaccinia haciendo crecer y cultivando un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, infectando dichas células con un virus de vaccinia e incubando el cultivo de células para propagar el virus de vaccinia. Las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). Según este aspecto de la invención, las células pueden ser células VERO, células CV-1, células RK, células BHK-21, células MRC-5 o cualquier célula en la que pueda crecer el virus de vaccinia. El virus de vaccinia puede ser un virus de vaccinia natural, una cepa del virus de vacuna antivariólica, cepas virulentas de vaccinia, cepas atenuadas de vaccinia y un virus de vaccinia recombinante.

También se proporciona la producción de ortomixovirus haciendo crecer y cultivando un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales elaborado a partir de medio basal que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, infectando las células con un ortomixovirus e incubando el cultivo de células para propagar el ortomixovirus. Las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). Las células pueden ser células BSC-1, células CV-1, células VERO, células MDBK, células MOCK, células MDOK, células BHK-21, células WI-38, células MRC-5 o cualquier célula en la que pueda propagarse el ortomixovirus. El ortomixovirus puede ser un virus de la gripe, tal como de la gripe A, B o C.

También se proporciona la producción de virus de Ross River haciendo crecer y cultivando un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales elaborado a partir de medio basal que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, infectando dichas células con un virus de Ross River e incubando el cultivo de células para propagar el virus de Ross River. Preferiblemente, las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). Las células pueden ser células BSC-1, células CV-1, células VERO, células MDBK, células MOCK, células CRFK, células BHK-21, células WI-38, células MRC-5 o cualquier célula en la que pueda propagarse el virus de Ross River.

Adicionalmente, se proporciona la producción de flavivirus haciendo crecer y cultivando un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales elaborado a partir de medio basal que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, infectando las células con un flavivirus e incubando el cultivo de células para propagar el flavivirus. Las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). El flavivirus puede ser virus de la fiebre amarilla o un derivado quimérico recombinante del mismo, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo occidental y virus de la hepatitis C. Los tipos celulares identificados en este documento pueden usarse para la propagación del flavivirus.

Se proporciona la producción de picornavirus haciendo crecer y cultivando un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales elaborado a partir de medio basal que comprende hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja, infectando las células con un picornavirus e incubando el cultivo de células para propagar el picornavirus. Las células se hacen crecer en un medio que comprende hidrolizado de soja en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1,0 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v). El picornavirus puede ser un virus de la polio o un virus de la hepatitis A. Los tipos celulares identificados en este documento pueden usarse para la propagación del picornavirus.

La invención también proporciona procedimientos para producir composiciones inmunógenas que comprenden un virus o un antígeno de un virus, que comprenden las etapas de hacer crecer un cultivo de células animales, en el que las células se seleccionan del grupo formado por células renales de mono, células renales de bovino, células renales de perro, células renales de cerdo, células renales de ratón, células renales de rata, células renales de oveja, células renales de conejo, células renales de hámster y células humanas, en un medio descrito en este documento; infectar las células con un virus elegido del grupo de ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus y adenovirus, incubar el cultivo de células para propagar el virus, recoger el virus producido y preparar una composición inmunógena a partir del virus recogido. El virus producido y recogido puede purificarse con un procedimiento conocido en la materia, tal como intercambio iónico o filtración en gel.

Habiendo descrito ahora de forma general esta invención, la misma se comprenderá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan en este documento con propósitos ilustrativos y no son en modo alguno limitantes.

## EJEMPLOS

### 30 Ejemplo 1

#### Formulación del medio de cultivo

Se prepara un medio exento de proteínas animales con un medio basal DMEM/HAM's F12 (1:1) que está complementado con sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes. También se añade bicarbonato sódico (1 – 3 g/L), L-glutamina (de 0,1 a 1 g/L) y concentraciones variables de hidrolizado de soja (Quest Technologies, Nueva York) o de hidrolizado de levadura (Deutsche Hefewerke, Alemania) o combinaciones de los mismos.

### Ejemplo 2

#### Propagación de células en medio exento de proteínas animales

##### Células VERO en medio exento de proteínas animales

Se usaron células VERO (mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*, riñón) como línea celular. Las células se habían obtenido de la American Type Cell Culture Collection, Rockville, Maryland, con un número de pases de 124 bajo la designación ATCC CCL 81. Las células se hicieron crecer en diversos medios según se describe en este documento.

Las células del banco de trabajo celular se expandieron en matraces en T y frascos rotatorios y sistemas microportadores con una tasa de escisión de 1:6 – 1:8. Las células se hicieron crecer a 37 °C durante 6 – 8 días. Las condiciones de cultivo de saturación de oxígeno del 20 % +/- 10 % y pH 7,1 +/- 0,35 se mantuvieron constantes. Al final de la producción de la biomasa, cuando las células habían alcanzado el crecimiento confluyente, se determinó la densidad celular y la tasa de consumo de oxígeno.

El número de células de la biomasa del cultivo celular al final de la producción de la biomasa se determinó bien mediante tripsinización de las células y un recuento con un citómetro CASY® (método A) según se describe en Schärfe y col. *Biotechnologie in LaborPraxis* 10: 1096 – 1103 1988), o bien mediante un tratamiento con ácido cítrico y violeta de cristal seguido de un recuento con un hemocitómetro (método B) según se describe en Sanford y col., J, *Nat'l Cancer Inst.* 11: 773 – 795 (1951).

Las células VERO se cultivaron y se hicieron crecer en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de levadura en una concentración del 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % o del 0,4 %, 0,5 % (p/v), o hidrolizado de soja en una concentración del 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % o del 0,4 %, 0,5 % (p/v), o hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura en una concentración entre levadura y soja (levadura/soja) del 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) o 0,2 %/1,0 % (p/v). La densidad celular del cultivo celular al final de la producción de la biomasa en el medio exento de proteínas animales que comprende concentraciones variables de hidrolizado de soja, hidrolizado de levadura o combinaciones de los mismos se calculó mediante los métodos A y B.

Los resultados demuestran que el hidrolizado de levadura y de soja sustentaron individualmente el crecimiento celular. A una concentración del 0,1 % de hidrolizado de levadura se alcanzó una densidad celular de aproximadamente



11,8 x 10<sup>5</sup> células/ml, sin embargo, la concentración creciente de hidrolizado de levadura hasta más del 0,3 % (p/v) tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento celular, y consecuentemente, sobre la densidad celular. Las concentraciones de hidrolizado de soja solo entre el 0,1 % (p/v) y el 0,2 % (p/v) mostraron un menor crecimiento celular y densidad celular que con concentraciones de soja del 0,3 % (p/v) y del 0,4 % (p/v). No obstante, la densidad celular y el consumo de oxígeno de las células cultivadas en medio que comprende un 0,3 % (p/v) o un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de soja no difieren significativamente, y concentraciones mayores de aproximadamente el 1 % p/v de hidrolizado de soja no tuvieron efectos positivos sobre el crecimiento celular. Se determinó que la concentración óptima del hidrolizado de soja solo estaba entre el 0,2 % p/v y el 1,0 % p/v. Complementando el medio basal con una combinación de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura, la densidad final alcanzada aumentó significativamente en comparación con un medio que comprendía únicamente hidrolizado de soja o de levadura. La densidad celular que se alcanzó a una concentración del 0,05 % (p/v) de soja y del 0,05 % (p/v) de levadura fue de aproximadamente 12,1 x 10<sup>5</sup> células/ml, y tenía una densidad de cultivo celular mayor en comparación con las células crecidas en medio que comprende únicamente bien un 0,1 % (p/v) de hidrolizado de soja (10 x 10<sup>5</sup> células/ml) o bien un 0,1 % (p/v) de hidrolizado de levadura (11,8 x 10<sup>5</sup> células/ml). La densidad celular de un cultivo celular crecido en un medio que comprende levadura con una concentración del 0,2 % (p/v) y de soja del 1,0 % (p/v) era similar a la densidad obtenida en un medio que comprende un 0,05 % (p/v) de soja y un 0,05 % de levadura (p/v).

El efecto más significativo sobre el crecimiento celular fue en el medio en el que la concentración de hidrolizado de soja en comparación con el hidrolizado de levadura era aproximadamente 2 – 3 veces mayor. Las células crecidas en medio que comprende hidrolizado de soja a una concentración de aproximadamente el 0,3 % (p/v) e hidrolizado de levadura de aproximadamente el 0,1 % (p/v) alcanzaron una densidad celular de aproximadamente 21,0 x 10<sup>5</sup> células/ml y mostraron por tanto una densidad celular aproximadamente 2 veces mayor en comparación con las células crecidas únicamente en hidrolizado de soja de aproximadamente un 0,4 % (p/v), y una densidad celular aproximadamente 2,5 veces mayor en comparación con las células cultivadas en un medio que comprende únicamente el hidrolizado de levadura de aproximadamente un 0,4 % (p/v). La actividad metabólica de las células cultivadas en un medio que comprende hidrolizado de levadura y de soja también fue mayor en comparación con células crecidas en un medio que comprende únicamente el hidrolizado de levadura o de soja. La tasa de consumo de oxígeno fue de 1,5 (% por min.) en un medio que comprende un 0,1 % (p/v) de hidrolizado de levadura, y de menos de 1,0 (% por min.) en un medio que comprende un 0,4 % (p/v) de hidrolizado de levadura o de hidrolizado de soja solos. En un medio que comprende un 0,1 % (p/v) de hidrolizado de levadura y un 0,3 % (p/v) de hidrolizado de soja, el consumo de oxígeno fue de aproximadamente 2,9 (% por min.), lo que era aproximadamente 2 veces mayor que el de las células cultivadas en un medio que comprende únicamente hidrolizado de soja o de levadura.

Adicionalmente, el ciclo celular, que es de 7 días en el medio exento de proteínas animales complementado con hidrolizado de levadura o de soja solos, se reduce a 6 días en el medio con la combinación de hidrolizados (soja y levadura).

### 35 Ejemplo 3. Ejemplo de referencia

#### **Propagación de células recombinantes**

Se cultiva un cultivo celular de células recombinantes de mamífero, tales como células rFVIII-CHO en un tanque agitado de 10 L con perfusión. Como medio de cultivo y crecimiento se usa un medio según el Ejemplo 1. Las células se inmovilizaron sobre un microportador poroso (Cytopore®, Pharmacia) y se cultivaron durante al menos 6 semanas. La tasa de perfusión es de 4 cambios de volumen por día; el pH es de 6,9 a 7,2; la concentración de O<sub>2</sub> es de aproximadamente el 20 – 50 % y la temperatura es de 37 °C. Se determina la densidad celular.

#### Ejemplo 4

#### **Comparación de la producción de antígenos víricos en células VERO crecidas en medio complementado con hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja**

##### 45 a. Producción de la biomasa del cultivo celular

Se descongelaron de nitrógeno líquido células VERO con un número definido de pasos y se pasaron en frascos de roux y giratorios para producir células suficientes para inocular un biorreactor de 1,5 litros. Las células se hacen crecer en un medio basal complementado bien con hidrolizado de levadura o bien con una combinación de hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja según se describe en los Ejemplos 1 y 2. Después de alcanzar la confluencia con una densidad celular final de 1,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, las células se liberaron del microportador con una fracción purificada de pronasa, la tripsina de *S. griseus* (SGT) según se describe en la solicitud EE.UU. con número de serie 10/006.223, y se transfirieron a un biorreactor de 10 litros. Esto a su vez se usó como inóculo para un biorreactor de 100 litros con una concentración de microportador de 3,0 g/l. Partiendo de una ampolla del banco celular del trabajo que contenía 10<sup>7</sup> células, se necesitaron aproximadamente 30 generaciones para alcanzar la biomasa confluyente final de células VERO en el último recipiente de fermentación. Las células se hicieron crecer a 37 °C. Las condiciones de cultivo de saturación de oxígeno del 20 % +/- 10 % y pH de 7,1 +/- 0,35 se mantuvieron constantes durante el proceso de propagación del virus.

Las células del banco de trabajo celular de células VERO se expandieron en matraces en T y en frascos rotatorios con una tasa de escisión de 1:6. Se realizó una propagación adicional de las células en un fermentador agitado de 1,5, 10 y 50 l como biorreactor usando un microportador Cytodex1® como sustrato de fijación. Las células se hicieron crecer a 37 °C. Las condiciones de cultivo de saturación de oxígeno del 20 % +/- 10 % y pH de 7,1 +/- 0,35 se mantuvieron constantes durante el proceso de propagación del virus.

b. **Propagación del virus de la gripe**

5 Se infectaron células VERO con dos cepas diferentes de gripe, New Caledonia A/H1N1 y Panama A/H3N2, y se propagaron en los medios respectivos. Al final del proceso de propagación del virus, el sobrenadante clarificado que contenía el virus se purificó mediante ultracentrifugación. La recolección de los cultivos de células VERO bien únicamente con hidrolizado de levadura o bien con hidrolizado de levadura y de soja se comparó sobre la base de la productividad volumétrica de antígeno (SRD total, *single radial immunodiffusion*, inmunodifusión radial individual) y el contenido en antígeno del sobrenadante al final de la serie (antígeno purificado en gradiente de densidad). Se compararon los rendimientos de ambas formulaciones de medio, y se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

10 **Comparación del rendimiento de producto en la producción de gripe VERO en diferentes composiciones de medio.**

	SRD (µg/ml)	Proteína (µg/ml)	SRD/Proteína	Dosis/Litro (por cepa)
Cepa	New Caledonia A/H1N1			
1 g/L de hidrolizado de levadura + 3 g/l de hidrolizado de soja	130	341	0,38	146
1 g/L de hidrolizado de levadura	51	147	0,35	57
Cepa	Panama A/H3N2			
1 g/L de hidrolizado de levadura + 3 g/l de hidrolizado de soja	130	233	0,56	103
1 g/L de hidrolizado de levadura	44	117	0,38	35

15 La combinación de hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja muestra una notable mejora con respecto al hidrolizado de levadura solo.

c. **Producción de Poxvirus**

20 Se infectaron células VERO con una cepa de producción de vacuna de viruela (Dryvax, Wyeth Vaccines, obtenida en Acambis, Inc., una cepa de vacuna de linfa bovina adaptada para un crecimiento en una línea celular permanente) adaptada para crecer en células VERO exentas de proteínas animales mediante pases sucesivos a una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*, m.o.i.) de 0,1 – 0,3. Después de un tiempo de incubación de 2 – 4 días a 37 °C, las células se recogieron y se recuperó el virus de las células.

La Tabla 2 muestra los resultados del rendimiento de virus obtenido de las células crecidas en medio basal complementado con hidrolizado de levadura solo o con hidrolizado de levadura y de soja.

**TABLA 2:**

25 **Determinación del título de virus de vaccinia al final del ciclo de producción en el sistema de biorreactor.**

Complemento del medio	moi	Título final (ufp)	Ufp/célula
1 g/l de hidrolizado de levadura	0,1 – 0,3	1,42 x 10 <sup>7</sup> /ml	14
1 g/l de hidrolizado de levadura + 3 g/l de hidrolizado de soja	0,1 – 0,3	16,00 x 10 <sup>7</sup> /ml	69

30 La combinación de hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja muestra una notable mejora con respecto al hidrolizado de levadura solo.

**d. Producción del virus de Ross River**

5 El cultivo de células VERO obtenido según se describe en este documento se infectó con el virus de Ross River Virus a una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection, m.o.i.*) de 0,1 - 0,3. Después de un tiempo de incubación de 2 – 4 días a 37 °C las células se recogieron y se recuperó el virus de las células. La Tabla 3 muestra los resultados del rendimiento de virus obtenido de las células crecidas en medio basal complementado con hidrolizado de levadura solo o con hidrolizado de levadura y de soja.

**TABLA 3**

10 **Determinación del título de virus de Ross River al final del ciclo de producción en el sistema de biorreactor.**

Complemento del medio	Título final (ufp)/ml)	Rendimiento relativo (%)
1 g/l de hidrolizado de levadura	1,5, x 10 <sup>7</sup>	100
1 g/l de hidrolizado de levadura + 3 g/l de hidrolizado de soja	2,5 x 10 <sup>7</sup>	167

La combinación de hidrolizado de levadura e hidrolizado de soja muestra una notable mejora con respecto al hidrolizado de levadura solo.

15 Debe entenderse que la descripción, los ejemplos específicos y los datos, aunque indican formas de realización ejemplares, se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención. Para el artesano experto serán apreciables diversos cambios y modificaciones en la presente invención a partir de la discusión, la descripción y los datos contenidos en la misma, y se consideran por lo tanto parte de la invención.

La presente descripción se refiere a los siguientes puntos:

- 20 1. Un medio de cultivo celular exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
2. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de al menos el 0,05 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de al menos el 0,05 % (p/v).
- 25 3. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de menos del 1,0 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de menos del 0,3 % (p/v).
- 30 4. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,2 % (p/v) a aproximadamente el 0,6 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,2 % (p/v).
- 35 5. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,25 % (p/v) a aproximadamente el 0,35 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,15 % (p/v).
- 40 6. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de aproximadamente el 0,3 % (p/v) y el hidrolizado de levadura está presente en una concentración de aproximadamente el 0,1 % (p/v).
7. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que hay presentes 3 partes en peso de hidrolizado de soja por 1 parte en peso de hidrolizado de levadura.
- 45 8. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de levadura es un hidrolizado de levadura purificado ultrafiltrado, y en el que al menos el 40 % de dicho hidrolizado de levadura tiene un peso molecular menor o igual a 500 Dalton.
9. El medio de cultivo celular exento de proteínas animales según el punto 1, en el que el hidrolizado de soja es un hidrolizado de soja purificado ultrafiltrado, y en el que al menos el 40 % de dicho hidrolizado de soja tiene un peso molecular menor o igual a 500 Dalton.
10. Un procedimiento para producir un medio de cultivo celular exento de proteínas animales, en el que un medio basal que está exento de cualquier proteína animal se complementa con un hidrolizado de levadura y un hidrolizado de soja.

11. El procedimiento según el punto 10, en el que la concentración del hidrolizado de soja es de al menos el 0,05 % (p/v) y la concentración del hidrolizado de levadura es de al menos el 0,05 % (p/v).
- 5 12. El procedimiento según el punto 10, en el que la concentración del hidrolizado de soja es de menos del 1,0 % (p/v) y la concentración del hidrolizado de levadura es de menos del 0,3 % (p/v).
13. Un procedimiento para cultivar un cultivo celular de células que comprende:  
 proporcionar un medio que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v); y  
 10 propagar las células en el medio para formar el cultivo celular.
14. El procedimiento según el punto 13, en el que las células son células animales elegidas del grupo formado por células de insecto, células de ave y células de mamífero.
15. El procedimiento según el punto 13, en el que las células son células recombinantes.
16. El procedimiento según el punto 13, en el que las células se seleccionan del grupo de células formado por 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 y células RK.
17. Un proceso de cultivo de células confluyentes exento de proteínas animales que comprende:  
 20 proporcionar un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura;  
 hacer crecer las células en el medio; y  
 pasar y subcultivar las células crecidas en el medio mientras están en contacto con una proteasa no derivada de animales con objeto de obtener un cultivo celular confluyente.
- 25 18. Un cultivo de células cultivado en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v).
- 30 19. El cultivo de células según el punto 18, en el que las células son células animales elegidas del grupo formado por células de insecto, células de ave y células de mamífero.
20. El cultivo de células según el punto 18, en el que las células son células recombinantes.
21. El cultivo de células cultivado según el punto 18, en el que las células están infectadas por un virus.
22. El cultivo de células según el punto 18, en el que las células se seleccionan del grupo de células formado por 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 y células RK.
- 35 23. Un procedimiento para producir un virus que comprende:  
 proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);  
 40 infectar las células con un virus; e  
 incubar las células infectadas para propagar el virus.
- 45 24. El procedimiento según el punto 21, en el que las células son células animales elegidas del grupo formado por células de insecto, células de ave y células de mamífero.
25. Un procedimiento para producir virus de vaccinia que comprende:  
 proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);  
 50

- infectar las células con el virus de vaccinia; e
- incubar las células infectadas para propagar el virus de vaccinia.
26. Un procedimiento para producir coronavirus que comprende:
- 5 proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);
- infectar las células con coronavirus; e
- incubar las células infectadas para propagar el coronavirus.
- 10 27. Un procedimiento para producir ortomixovirus que comprende:
- proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);
- 15 infectar las células con ortomixovirus; e
- incubar las células infectadas para propagar el ortomixovirus.
28. El procedimiento según el punto 27, en el que el ortomixovirus es virus de la gripe A, B o C.
29. Un procedimiento para producir virus de Ross River que comprende:
- 20 proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);
- infectar las células con virus de Ross River; e
- incubar las células infectadas para propagar el virus de Ross River.
- 25 30. Un procedimiento para producir flavivirus que comprende:
- proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);
- 30 infectar las células con flavivirus; e
- incubar las células infectadas para propagar el flavivirus.
31. El procedimiento según el punto 30, en el que el flavivirus se selecciona del grupo formado por virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo occidental y virus de la hepatitis C.
- 35 32. Un procedimiento para producir picornavirus que comprende:
- proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);
- 40 infectar las células con picornavirus; e
- incubar las células infectadas para propagar el picornavirus.
33. El procedimiento según el punto 32, en el que el picornavirus se selecciona del grupo formado por virus de la polio y virus de la hepatitis A.
- 45 34. Un procedimiento para producir una composición inmunógena que comprende un virus o un antígeno del virus, en el que el procedimiento comprende:
- proporcionar un cultivo de células que han crecido en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v);

infectar las células con el virus;

incubar las células infectadas para propagar el virus;

recoger el virus o el antígeno del virus producido

preparar una composición inmunógena a partir del virus o del antígeno del virus recogido.

- 5 35. El procedimiento según el punto 34, en el que dicho virus o antígeno del virus recogido se somete a una purificación.
36. Un procedimiento para producir una composición inmunógena que comprende un virus o un antígeno del virus, en el que el procedimiento comprende:
- 10 proporcionar un cultivo de células de mamífero, en el que las células se seleccionan del grupo de células renales de mono, células renales de bovino, células renales de perro, células renales de cerdo, células renales de ratón, células renales de rata, células renales de oveja, células renales de hámster y células humanas que han crecido en un medio de cultivo exento de proteínas animales que comprende un hidrolizado de soja y un hidrolizado de levadura;
- infectar las células con un virus elegido del grupo de ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus y adenovirus;
- 15 incubar el cultivo de células para propagar el virus;
- recoger el virus o el antígeno del virus así producido; y
- preparar una composición inmunógena a partir del virus o del antígeno del virus recogido.
37. Un cultivo de células infectado por ortomixovirus, en el que las células se cultivan en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
- 20 38. El cultivo según el punto 37, en el que el hidrolizado de soja está presente en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) y el hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v).
39. Un cultivo de células infectado por poxvirus, en el que las células se cultivan en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
- 25 40. El cultivo según el punto 39, en el que el hidrolizado de soja está en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) y el hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v).
41. Un cultivo de células infectado por virus herpes, en el que las células se cultivan en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
- 30 42. El cultivo según el punto 41, en el que el hidrolizado de soja está en una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 1 % (p/v) y el hidrolizado de levadura a una concentración de entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) a aproximadamente el 0,3 % (p/v).
43. Una preparación de ortomixovirus que está exenta de proteínas animales, en la que la preparación se obtiene cultivando células infectadas por virus de la gripe en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
- 35 44. Una preparación de virus herpes que está exenta de proteínas animales, en la que la preparación se obtiene cultivando células infectadas por virus de la gripe en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.
- 40 45. Una preparación de poxvirus que está exenta de proteínas animales, en la que la preparación se obtiene cultivando células infectadas por virus de la gripe en un medio exento de proteínas animales, en el que el medio comprende hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para producir un virus que comprende:  
 hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración de entre el 0,05 % (p/v) al 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración de entre el 0,05 % (p/v) al 0,3 % (p/v);  
 infectar las células con un virus; e  
 incubar las células infectadas para propagar el virus.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células son células animales elegidas del grupo de células de insecto, células de ave y células de mamífero.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dichas células de mamífero se seleccionan del grupo de 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 y células MRC-5.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho virus se selecciona del grupo del virus de la gripe, virus de vaccinia y de la viruela, virus de la viruela aviar, virus de la viruela vacuna, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (*tick-borne encephalitis*, TBE), virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de Ross River, virus de la fiebre amarilla y un virus quimérico derivado del mismo, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubéola, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial (*respiratory syncytial virus*, RSV), virus del herpes simple (*herpes simplex virus*, HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), rotavirus y virus de la glosopeda (*foot and mouth disease virus*, FMDV).
5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células son células VERO y dicho virus se selecciona del grupo del virus de la gripe, virus de la TBE, virus de vaccinia, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de Ross River, virus de la fiebre amarilla y un virus quimérico derivado del mismo, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubéola, HCV, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, HSV, CMV, EBV y rotavirus.
6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho hidrolizado de soja y dicho hidrolizado de levadura están purificados.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho hidrolizado de soja y dicho hidrolizado de levadura están ultrafiltrados.
8. Un procedimiento para producir una composición inmunógena que comprende un virus o un antígeno del virus, en el que el procedimiento comprende:  
 hacer crecer un cultivo de células en un medio exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración del 0,05 % (p/v) al 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración del 0,05 % (p/v) al 0,3 % (p/v);  
 infectar las células con el virus;  
 incubar las células infectadas para propagar el virus;  
 recoger el virus o el antígeno del virus producido  
 preparar una composición inmunógena a partir del virus o del antígeno del virus recogido.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho virus o antígeno del virus recogido se somete a una purificación.
10. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende:  
 hacer crecer un cultivo de células de mamífero, en el que las células se seleccionan del grupo de células renales de mono, células renales de bovino, células renales de perro, células renales de cerdo, células renales de ratón, células renales de rata, células renales de oveja, células renales de hámster y células humanas en un medio de cultivo exento de proteínas animales que comprende hidrolizado de soja a una concentración del 0,05 % (p/v) al 1 % (p/v) e hidrolizado de levadura a una concentración del 0,05 % (p/v) al 0,3 % (p/v);  
 infectar las células con un virus elegido del grupo de ortomixovirus, paramixovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, virus herpes, poxvirus, coronavirus y adenovirus;  
 incubar el cultivo de células para propagar el virus;  
 recoger el virus o el antígeno del virus así producido; y  
 preparar una composición inmunógena a partir del virus o del antígeno del virus recogido.

11. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho hidrolizado de soja y dicho hidrolizado de levadura están purificados.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho hidrolizado de soja y dicho hidrolizado de levadura están ultrafiltrados.
- 5 13. El procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que el virus se selecciona del grupo del virus de la gripe, virus de vaccinia y de la viruela, virus de la viruela aviar, virus de la viruela vacuna, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (*tick-borne encephalitis*, TBE), virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de Ross River, virus de la fiebre amarilla y un virus quimérico derivado del mismo, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la rubéola, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial (*respiratory syncytial virus*, RSV), virus del herpes simple (*herpes simplex virus*, HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), rotavirus y virus de la glosopeda (*foot and mouth disease virus*, FMDV).
- 10 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 ó 13, en el que las células son células VERO y el virus es el virus de la gripe.