



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 352**

51 Int. Cl.:
C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05790041 .7**

96 Fecha de presentación : **07.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1797174**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de material vírico.**

30 Prioridad: **09.10.2004 DE 10 2004 049 290**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010

73 Titular/es: **AiCuris GmbH & Co. KG.**
Friedrich-Ebert-Strasse 475
42117 Wuppertal, DE

72 Inventor/es: **Pohlscheidt, Michael;**
Bodeker, Berthold;
Minuth, Torsten;
Apeler, Heiner;
Langer, Uwe;
Brabender, Katrin;
Otto-Brabender, Dirk;
Kerper, Joachim y
Henzler, Hans-Jürgen

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 341 352 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

Procedimiento para la preparación de material vírico.

5 **El campo técnico**

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de suspensiones de virus. La invención se refiere en particular a un procedimiento para la preparación de suspensiones de virus de titulación elevada en cultivos celulares. Los procedimientos preferidos comprenden un aumento de volumen del cultivo celular antes de la infección con material vírico y otras etapas o aumentos de volumen sucesivos, hasta llegar a un volumen final que es claramente superior al volumen máximo del cultivo antes de la infección.

Estado actual de la técnica

15 En el estado actual de la técnica se conocen varios procedimientos para la preparación de material vírico. En particular, se conocen procedimientos en los que el material vírico se prepara a partir de cultivos celulares animales.

20 El experto diferencia entre las líneas celulares de crecimiento adherente, es decir, las líneas celulares que crecen con preferencia sobre superficies sólidas, de las líneas celulares que crecen preferentemente en suspensión. Las líneas celulares de crecimiento adherente se cultivan o bien directamente sobre la superficie del recipiente de cultivo usado o crecen sobre partículas sólidas (por ej. sobre microsoportes (microcarriers)), que por su parte pueden estar presentes en suspensión en un medio de cultivo.

25 Se conocen procedimientos para la preparación de material vírico que usan líneas celulares que crecen en suspensión, así como también aquellos procedimientos que usan líneas celulares de crecimiento adherente.

30 En la preparación de suspensiones de virus con cultivos celulares tiene una gran importancia la composición del medio. En muchos casos es necesario añadir suero fetal de ternera (FCS) y factores de crecimiento de origen animal o vegetal. Además de las oscilaciones de las cargas y de los componentes proteínicos perturbadores en el procesamiento, el uso de suero significa un riesgo de seguridad biológico (BSE/TSE, micoplasmas, priones, etc.). Por lo tanto, ha de darse preferencia a los medios libres de suero y a ser posible sintéticos [MERTEN *ET AL.* 1994].

35 En particular al usar células adherentes, como por ej. en el caso de los cultivos sobre microsoportes, además de las típicas barreras técnicas del aumento de escala, como por ej. el mantenimiento de un suministro suficiente de oxígeno, la eliminación del CO₂ o una homogeneización suficiente del cultivo de fermentos con un esfuerzo de cizallamiento mínimo, surgen también y de manera especial problemas en la inoculación de la siguiente escala del proceso de mayor dimensión [GLACKEN *ET AL.* 1990, J.B. GRIFFITHS *ET AL.* 1985, AMERSHAM 2001].

40 La “migración directa” de un soporte a otro de células de crecimiento adherente puro sólo puede producirse mediante una manipulación del proceso, de suerte que debido a la manipulación las células pierden su adherencia al menos en parte. El experto conoce estrategias para eliminar la adherencia de células de crecimiento adherente y las enzimas que se usan para ello [E. LINDNER *ET AL.* 1987, AMERSHAM 2001, DÜRRSCHMID *ET AL.* 2003] y deben tenerse en cuenta en el desarrollo del proceso en lo que respecta a la separación o la inactivación de las enzimas usadas. A una escala menor, en las décadas de 1970 y 1980 se llevaron a cabo con éxito experimentos para la migración celular directa desde la superficie de recipientes a microsoportes en botellas de cultivo rotatorias, placas Petri y frascos T. El experto conoce la migración con éxito de células de crecimiento adherente de un soporte a otro únicamente en reactores de lecho fijo siendo necesario reseñar, limitándolo, que en este caso se trata de líneas celulares que crecen tanto en suspensión como también de modo adherente [AMERSHAM 2001, DÜRRSCHMID *ET AL.* 2003].

50 El modo en que se lleva a cabo el proceso, en especial, desempeña un gran papel. En la literatura se describen diferentes procedimientos tales como, por ejemplo, los cultivos por lotes o por perfusión. Los cultivos por perfusión se usan para desacoplar el tiempo de permanencia de la tasa de crecimiento específica y para evitar los inhibidores o limitadores del medio de cultivo y aumentar de este modo la productividad, manteniéndose estos cultivos a menudo a lo largo de varios meses en el modo de “cultivo celular de alta densidad” (“High Density Cell Culture” (HDCC)). Sin embargo, estos sistemas requieren períodos de arranque complejos y lentos además de complicados dispositivos periféricos (separadores, filtros spin, retención celular con ultrasonidos, etc.) [M. REITER *ET AL.* 1989, GLACKEN *ET AL.* 1990, GRIFFITHS *ET AL.* 1985, AMERSHAM 2001, DÜRRSCHMID *ET AL.* 2003A].

60 Una posibilidad adicional para conseguir un suministro suficiente de nutrientes lo constituye el aporte al cultivo celular de soluciones de sustrato muy concentradas. En particular con la modalidad HDCC, las inhibiciones resultantes del aporte, como por ejemplo amonio y/o lactato, pueden dar lugar a productividades y rendimientos más bajos. Hasta la fecha, para evitar las concentraciones inhibitorias se recomiendan los sistemas de perfusión o de diálisis.

65 En el campo de la preparación de material vírico por medio de cultivos celulares animales, en la que deben tenerse en cuenta las complejas cinéticas acopladas de las células y del virus, pueden surgir problemas en la realización del proceso en especial cuando se usan cultivos celulares sobre microsoportes.

ES 2 341 352 T3

Así por ejemplo, resulta cuestionable el aprovechamiento mediante perfusión compleja de la propagación de un virus causante de un CPE (efecto citopático) ya que los virus destruyen o lisan las células por lo general en un plazo breve (en parte inferior a los 3 a 7 días siguientes a la infección).

5 En la literatura se describen procesos por lotes para la multiplicación de virus a escala piloto y de producción (50 a 1.000:1). En todos los procesos de microsoporte descritos, la multiplicación de los virus se lleva a cabo con densidades celulares relativamente pequeñas. Después de la infección con el virus que hay que propagar, hasta la recolección la infección transcurre aproximadamente al volumen final tardío de la escala de producción [B. MONTAGNON *ET AL.* 1984, BAIJOT *ET AL.* 1987]. En algunos casos se han descrito cultivos por perfusión para virus lentos o no lisantes a
10 escala de laboratorio. En un caso se describe un cambio del medio hasta el volumen original. [AMEMHAM 2001].

Los documentos US 6,455,298-B1 y US 6,656,720-B2 describen un procedimiento para la preparación de material vírico de la influenza con líneas celulares creciendo en suspensión. El procedimiento dado a conocer comprende una primera fase de cultivo en la que el material celular se multiplica en un cultivo en suspensión, una etapa de infección
15 y a continuación una segunda fase de cultivo en la que se produce el virus. Durante esta fase se puede diluir más el cultivo añadiendo medio o bien llevándolo a cabo del mismo modo que un cultivo por perfusión. Lo ventajoso de este procedimiento es el hecho de que la capacidad del procedimiento no se ve circunscrita por la extensión limitada de la superficie interior de los recipientes de cultivo.

20 Sin embargo, resulta desventajoso que en el cultivo en suspensión no pueden alcanzarse densidades celulares tan altas como las que son posibles con los procedimientos basados en microsoportes para la producción de virus. Además, la separación del material celular del medio de cultivo en los cultivos en suspensión es mucho más laboriosa que en el caso de los procedimientos basados en microsoportes. En el procedimiento conforme a la presente invención se soslayan estas desventajas, puesto que aquí se usan líneas celulares de crecimiento adherente sobre microsoportes
25 para la preparación del material vírico.

Los documentos US 6,726,907 y WO 95/24468 describen procedimientos para la preparación de material vírico que comprenden una primera fase de cultivo para la multiplicación del material celular, una etapa de infección y a continuación una segunda fase de cultivo en la que se produce el material vírico. A diferencia del procedimiento
30 conforme a la invención, en la segunda etapa de cultivo no se lleva a cabo ningún aporte de medio de cultivo, de tal manera que el volumen del cultivo no aumenta más durante la segunda etapa de cultivo. El resultado es un volumen de recolección relativamente bajo, presentando además el cultivo una titulación de virus más pequeña en comparación con el procedimiento conforme a la invención.

35 Los documentos US 5,994,134, US 5,719,051 y US 6,194,210 dan a conocer procedimientos basados en microsoportes para la preparación de material vírico que igualmente comprenden una primera fase de cultivo, una etapa de infección y una segunda fase de cultivo. A diferencia del procedimiento conforme a la presente invención, esta segunda fase de cultivo no va acompañada de un aumento del volumen del cultivo, sino que esta segunda fase de cultivo se lleva a cabo como un cultivo por perfusión. Se produce un aporte continuo de medio de cultivo fresco mientras
40 que al mismo tiempo se extrae una corriente de igual volumen de medio de cultivo, de tal manera que el volumen de cultivo se mantiene constante. Frente a los procedimientos con líneas celulares en suspensión que se han descrito anteriormente, en este procedimiento resulta ventajoso que, por un lado, pueda conseguirse una mayor densidad celular y que, por otro lado, se puedan recolectar a lo largo de un período prolongado grandes cantidades de medio de cultivo que contiene virus. Sin embargo, este procedimiento para la preparación de material vírico basado en microsoportes
45 tiene la desventaja de que los medios de cultivo que contienen virus que se obtienen presentan una titulación de virus (partículas víricas por unidad de volumen) menor en comparación con el procedimiento conforme a la invención. Esto dificulta el aislamiento del material vírico y con ello eleva los costes del producto. Además, el aporte de medio de cultivo fresco y la extracción simultánea de caldo de cultivo que contiene virus supone una gran exigencia en cuanto a la técnica estéril y aumenta el riesgo de contaminaciones. El uso de procedimientos para la preparación de material
50 vírico con una segunda fase de cultivo en el modo de perfusión no es posible si el virus que hay que producir provoca la lisis de las células productoras y causa con ello un efecto citopático (CPE).

Esto tiene igualmente validez para el complejo procedimiento de la diálisis externa o interna, en el intercambio de sustancias a través de membranas semipermeables con un límite específico de exclusión molecular. Para ello, el medio
55 usado debe separarse de las células antes de que a través de una membrana dispuesta externamente se dialice frente a medio de cultivo fresco, en un procedimiento de contracorriente o de corriente continua. Además del bloqueo de la membrana dentro del módulo a causa de los residuos celulares, etc., resultan problemáticos sobre todo el empleo de aparatos y el aumento de la escala.

60 **Breve descripción de la invención**

Teniendo en cuenta el estado actual de la técnica que se ha descrito anteriormente, el objetivo técnico que constituye la base de la presente invención es facilitar un procedimiento de preparación para material vírico con el que, en un tiempo relativamente corto, puedan producirse grandes cantidades de suspensión vírica que contengan una alta
65 concentración de material vírico.

Este problema técnico se resuelve conforme a la invención por medio de un procedimiento para la preparación de material vírico en un cultivo celular sobre microsoportes, que comprende (a) una primera fase de cultivo que compren-

de un aumento del volumen del cultivo celular mediante la adición de medio de cultivo y material de microsoporte, alcanzándose un primer volumen máximo de cultivo celular; (b) una etapa de infección que tiene lugar después de la mencionada primera fase de cultivo y que comprende la adición de material vírico infeccioso al mencionado cultivo celular con microsoportes; (c) una segunda fase de cultivo que tiene lugar después de la mencionada etapa de infección y que comprende un aumento adicional del volumen del cultivo celular hasta un segundo volumen de cultivo celular máximo, generándose material vírico durante la segunda fase de cultivo; y (d) una etapa de recolección para obtener el material vírico a partir del cultivo celular con microsoportes, estando caracterizado el procedimiento porque el mencionado segundo volumen de cultivo máximo es de dos a siete veces mayor que el mencionado primer volumen de cultivo máximo.

Con el procedimiento conforme a la invención resulta ventajoso en especial el hecho de que la titulación de virus del caldo de cultivo se puede aumentar 10 veces en relación al proceso por lotes mediante el aporte de medio de cultivo después de la etapa de infección. Resulta especialmente ventajoso el hecho de que este aumento de la titulación de virus también puede conseguirse si no se aporta medio de cultivo concentrado después de la etapa de infección, de tal modo que durante la segunda fase de cultivo se vuelve a aumentar de manera considerable el volumen de cultivo. De esta manera, frente al procedimiento conforme a la invención con aporte de concentrado se puede volver a aumentar de manera considerable la cantidad absoluta de material vírico producido.

Otras formas adicionales de realización de la invención las puede deducir el experto estudiando los ejemplos y explicaciones que se indican más adelante.

Ilustraciones

Figura 1: Representación a modo de ejemplo del procedimiento conforme a la invención con variaciones de volumen de 10 litros a 800 litros pasado por 50 litros y 200 litros. La infección se lleva a cabo a la escala de 200 litros. (Abreviaturas: pre, cultivo previo; inf, infección; H/DP, recolección/preparación).

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de suspensiones de virus. Los procedimientos conforme a la invención presentan como mínimo 2 fases de cultivo. Durante la primera fase de cultivo (antes de la etapa de infección) se aumenta el volumen de cultivo varias veces o de manera continua. En el procedimiento conforme a la invención después de la etapa de infección se aumenta el volumen del cultivo de manera continua o por etapas, de tal manera que el volumen final que hay que recolectar es notablemente mayor que el volumen de cultivo máximo antes de la infección.

La invención se refiere a:

1. Un procedimiento para la preparación de material vírico en un cultivo celular con microsoportes, que comprende
 - (a) una primera fase de cultivo que comprende un aumento del volumen del cultivo celular mediante la adición de medio de cultivo y material de microsoporte, alcanzándose un primer volumen de cultivo celular máximo;
 - (b) una etapa de infección que tiene lugar después de la mencionada primera fase de cultivo y que comprende la adición de material vírico infeccioso al mencionado cultivo celular con microsoportes;
 - (c) una segunda fase de cultivo que tiene lugar después de la mencionada etapa de infección y que comprende un aumento adicional del volumen del cultivo celular hasta un segundo volumen de cultivo celular máximo, generándose material vírico durante la segunda fase de cultivo; y
 - (d) una etapa de recolección para obtener el material vírico a partir del cultivo celular con microsoportes, caracterizado porque el mencionado segundo volumen de cultivo máximo es de dos a siete veces mayor que el mencionado primer volumen de cultivo máximo.
2. Un procedimiento conforme al punto 1, siendo el mencionado segundo volumen de cultivo máximo de tres a cuatro veces mayor que el mencionado primer volumen de cultivo máximo.
3. Un procedimiento conforme a uno de los puntos 1 a 2 en el que el mencionado aumento del volumen del cultivo celular se consigue mediante la adición de medio de cultivo no concentrado.
4. Un procedimiento conforme a uno de los puntos 1 a 3 en el que se usa un medio de cultivo libre de suero.
5. Un procedimiento conforme a uno de los puntos 1 a 4 en el que en la etapa de infección se usa una multiplicidad de infección (MI) de 0,001 a 2.

ES 2 341 352 T3

El núcleo de la invención es un aumento secuencial o continuo significativo del volumen de producción de manera preferente con medio de cultivo del mismo tipo, o con medio de cultivo de tipo similar. El aumento de la eficiencia en comparación con el procedimiento clásico se describe a continuación con el ejemplo de la propagación de *Parapoxvirus ovis*.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10

Se cultivó primero una línea celular *Bovine Kidney* adherente conocida en cultivos estacionarios (cubetas de cultivo apilables, botellas rotatorias) o en cultivo celular con microsoportes por lotes. Se usó para ello una concentración de microsoportes de 1 a 8 g/l, con preferencia de 3 a 7 g/l. La inoculación del reactor se realizó con 1 a $6 \cdot 10^5$ células/ml. Después de que se hubieran consumido los nutrientes, durante esta fase de multiplicación celular se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo a través de la sedimentación de los microsoportes. Después de alcanzarse el número máximo de células de 0,2 a $2 \cdot 10^7$ células/ml, con preferencia de 0,3 a $0,7 \cdot 10^7$ células/ml, en el caso del cultivo con medios que contienen suplementos nutrientes para reducir la concentración de suplementos tales como por ejemplo FCS, hormonas del crecimiento, etc., se llevaron a cabo etapas de lavado a través de una sedimentación múltiple y sustitución del sobrenadante con medio de cultivo sin suplementos o con una concentración de suplementos notablemente inferior. A continuación se realizó la infección con una multiplicidad de infección (MI) de entre 0,001 y 2, con preferencia de entre 0,005 y 0,1.

15

20

La infección se realizó en un volumen de cultivo del 10 al 100% del volumen de fermentador. La infección transcurrió sin ninguna manipulación adicional en el modo de lotes durante aproximadamente de 3 a 15 días, con preferencia de 7 a 11 días. Al alcanzarse un efecto citopático (CPE) de las células infectadas de entre el 40 y el 100%, con preferencia del 40-90%, se procedió a recolectar el cultivo.

25

La aplicación de gas se lleva a cabo por ejemplo aplicándolo a través de una membrana sin producir burbujas y con poca desviación. El pO_2 se ajusta entre el 15 y el 65%, con preferencia entre el 25 y el 55%.

30

El pH se ajusta con bicarbonato sódico, hidróxido sódico y/o gas CO_2 a pH 6,6 a pH 7,6, con preferencia pH 6,9 a pH 7,5. La temperatura asciende a entre 32°C y 37°C. Los parámetros ajustados en la fase de crecimiento celular y en la fase de propagación del virus pueden ser diferentes.

35

Se puede conseguir una optimización adicional del rendimiento de virus mediante el aporte de concentrados de medio de cultivo o concentrados de sustratos individuales durante la fase de propagación del virus. Este tipo de realización del proceso se ha descrito y ha adquirido carta de naturaleza para distintos sistemas. No obstante, en caso de usarse líneas celulares adherentes para la propagación de virus en cultivos con microsoportes, la determinación de las tasas de consumo específico esencialmente necesarias resulta ser extraordinariamente difícil, lo cual está en parte en correlación con los problemas del recuento de células que conocen los expertos. Incluso si se conocen las tasas de consumo individuales para los sustratos, se plantea la cuestión adicional de las inhibiciones del cultivo. En la literatura se han descrito sobre todo limitaciones por amonio o lactato. Puesto que no existe ningún valor umbral de validez general, hay que determinarlo de manera específica para el sistema biológico usado.

40

Si se detecta una limitación/inhibición, hay que soslayarla para conseguir una titulación alta del producto. Por lo tanto, en los últimos años se han usado cultivos por perfusión o diálisis, en especial en el campo del HDCC, cuyas desventajas acerca de la propagación de un virus causante de CPE ya se han discutido.

45

Ejemplo 2

A continuación se va a comparar el procedimiento en lotes alimentados de volumen ampliado ("volume-expanded-fed-batch") (VEF) conforme a la invención con el procedimiento conocido del estado actual de la técnica.

55

El ya mencionado aumento de volumen secuencial por medio de la dilución del cultivo con medio de cultivo fresco después de la infección (por ejemplo en la siguiente escala del proceso: 1:2-1:7, con preferencia 1:3-1:5), de manera asombrosa no mostró la esperada disminución de la titulación de virus sino que de manera sorprendente se pudo aumentar la titulación en promedio de 8 a 13 veces, a pesar de la dilución. Esto se consiguió a pesar de que el volumen se había aumentado en el factor 2 a 7, con preferencia en el factor 3 a 4, en comparación con el procedimiento por lotes descrito. El resultado de todo ello es un rendimiento de virus mejorado de forma considerable.

60

Con los procedimientos de comparación descritos y llevados a cabo varias veces tales como por ejemplo diálisis, aporte de concentrados, perfusión y/o mediante simple disminución del número de células, no se pudieron alcanzar o aumentar estos rendimientos (Tabla 1).

65

ES 2 341 352 T3

TABLA 1

Comparación de los procedimientos conocidos con el procedimiento en lotes alimentados de volumen ampliado, comenzando por ejemplo en el reactor de 3,5 litros. Se representan a modo de ejemplo pasadas con un tiempo de paso equiparable y un número de células equiparable para la propagación del PPVO por medio de una línea celular BK adherente. Las condiciones de cultivo ya se han mencionado anteriormente en la descripción del procedimiento por lotes y son válidas también para los otros procedimientos. Para la diálisis se usó un módulo con una exclusión de peso molecular de 20 kD, llevándose a cabo el cultivo previo en el modo de perfusión. La diálisis se realizó en el procedimiento de contracorriente. Se representan valores relativos con relación al cultivo por lotes

| | Por lotes | Diálisis | En lotes alimentados [con medio de cultivo concentrado] | En lotes alimentados de volumen ampliado [con medio de cultivo no concentrado] |
|---|-----------|----------|---|--|
| TCID ₅₀ [con relación al lote] | 1 | 10 | 9 | 10 |
| Volumen final [con relación al lote] | 1 | 1 | 1 | 4 |
| Productividad [con relación al lote] | 1 | 10 | 9 | 40 |

Además del considerable aumento en el rendimiento de virus, pueden observarse también efectos positivos resultantes sobre todo en los procesos downstream. Estos últimos se traducen sobre todo en menores impurezas celulares tales como proteínas de la célula huésped, proteínas y ADN por unidad de dosis (de especial importancia en el uso de agentes terapéuticos humanos similares a vacunas), así como en menores pérdidas de rendimiento después del filtrado. Por término medio, por ejemplo con una filtración con 20 μm se consigue una pérdida de $\sim 0,6\text{-}1 \log \text{TCID}_{50}$ en el modo por lotes. Como comparación, en lotes alimentados de volumen ampliado sólo cabe reseñar una pérdida de $\sim 0,1\text{-}0,4 \log \text{TCID}_{50}$.

El aumento del volumen ejerce igualmente una influencia positiva sobre las barreras técnicas ya descrita del aumento de la escala. En el caso del suministro de oxígeno, por ejemplo mediante el procedimiento de aplicarlo a través de una membrana que evita producir burbujas y produce poca desviación, con sucesivos aumentos de volumen a través de una dilución puede conseguirse un aumento significativo de la escala (resultante de los parámetros físicos de los reactores), puesto que con la disminución del número de células a causa de la dilución y de la lisis provocada por el virus hay que aportar menos oxígeno al sistema. Para que se entienda mejor, en la Figura 1 se muestra a modo de ejemplo el procedimiento en una escala relevante para la producción. En los experimentos se confirmaron las etapas representadas, en particular con respecto a la frecuencia y la eficiencia de la migración directa con la transferencia directa de las células BK en la siguiente escala de fermentación. No se observó ningún efecto sobre la productividad.

La representación a modo de ejemplo comienza con la inoculación del reactor de 10 litros. El proceso se lleva a cabo de la misma manera que ya se ha descrito con anterioridad para el modo de lotes. Después de alcanzarse la confluencia, se produce una dilución directa 1:5 en la escala de 50 litros con microsoportes frescos en la misma o equiparable proporción al medio de cultivo que en la escala de 10 litros. Después de alcanzarse otra vez la confluencia, se inocula con el mismo procedimiento el reactor de 200 litros. Puede ser ventajosa una breve sedimentación con o sin agitación interna.

Si durante la fase de crecimiento se hubiera usado un medio de cultivo que tuviera suero/proteínas, se realizan etapas de lavado con medio de cultivo libre de suero y proteínas para reducir la concentración de suplementos. La infección se lleva a cabo con la MI descrita lo mismo que en el procedimiento por lotes.

10-36 horas después de la infección se realiza entonces el procedimiento en lotes alimentados de volumen ampliado. Se trata de una dilución segura y robusta de la suspensión con medio de cultivo fresco, pudiendo realizarse esto en el mismo reactor o en reactores más grandes. Para ello sólo hace falta un pequeño esfuerzo. La suspensión de células-virus de 200 litros se aumenta por etapas a intervalos apropiados y/o de manera continua por ejemplo a 400 litros, después a 600 litros y por último a 800 litros. De manera sorprendente esto no condujo, tal como ya se ha descrito y se ha representado en la Tabla 1, a un empeoramiento de la productividad de virus.

No pudieron detectarse diferencias entre células cultivadas en medios que contenían suero, medios que contenían proteínas y medios sintéticos. En el ejemplo de las líneas celulares *Bovine Kidney* adaptadas a condiciones sintéticas

ES 2 341 352 T3

y libres de suero, no se constató ninguna diferencia en lo que respecta a la migración de un soporte a otro, el número de células y la productividad. Esto significa que el procedimiento puede usarse para medios de cultivo que contiene suero, que contienen proteínas y sintéticos.

5

TABLA 2

Comparación a modo de ejemplo del TCID₅₀ de la línea celular BK adaptada a condiciones con suero, libres de suero y sintéticas para la propagación del virus PPVO con distintos procedimientos en relación a la titulación normalizada (aquí con contenido de suero)

10

| | Con suero | Con proteína | Sintético |
|--------------------------------------|-----------|--------------|-----------|
| Botella rotatoria | 1 | 0,9 | 1 |
| Cultivo por lotes | 1 | 1,1 | 1 |
| Lote alimentado de volumen aumentado | 1 | 0,9 | 1,1 |

15

20

Las ventajas conforme a la invención del procedimiento de “lotes alimentados de volumen aumentado” descrito frente a los procedimientos conocidos y ya establecidos pueden resumirse de la siguiente manera: (1) Se trata de un procedimiento seguro, robusto y eficiente para la propagación de virus. (2) Se consiguen rendimientos de virus más elevados. (3) No hay ninguna necesidad de un mayor equipamiento. (3) El procedimiento se lleva a cabo de una manera relativamente sencilla. (4) La necesidad de personal para vigilar los procesos es reducida. (5) Se mejora la calidad del producto con respecto a las etapas de procesamiento posteriores. (6) Se pueden usar fermentadores más grandes. (7) Se puede escalar de manera sencilla. (8) El procedimiento puede adaptarse a distintos medios de cultivo que contengan suero, que estén libres de suero, que contengan proteína y que sea sintéticos.

25

30

Ejemplo 3

Propagación del PPVO en la caldera de agitación de 10 l mediante cultivo celular con microsoportes usando un medio de cultivo que contiene proteína

35

La línea celular *Bovine Kidney* adaptada a condiciones libres de suero pero con contenido de proteína se cultivó, partiendo del banco de células, primero en frascos T y después en botellas rotatorias. El cultivo se llevó a cabo a 37°C y un valor de pH de 7,2 +/- 0,2 en estufa de incubación a la que se aplicó gas CO₂. La recolección del material celular se realizó mediante tripsinización.

40

La concentración de los microsoportes Cytodex 3 de la empresa Amersham, Suecia, preparados conforme a las instrucciones del comerciante ascendía a 3 g/l. La inoculación se llevó a cabo en 10 litros con un número de células de 2 E05 cel./ml. Durante la fase de cultivo celular y mediante sedimentación se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo a una concentración de glucosa c < 0,5 g/l. El reactor se agitó con ayuda de un agitador inducido con 30 rpm. El pO₂ se ajustó al 40% +/- 10%. El valor del pH ascendía a 7,2 +/- 0,2.

45

Después de 10 días se alcanzó un número de células de 3,1 E06 Z/ml, encontrándose las células en la fase de crecimiento estacionario. Después de tres etapas de lavado con medio de cultivo sin suplementos se llevó a cabo la infección con PPVO (MI = 0,01) en el volumen final.

50

Durante la posterior propagación del virus no se realizó ninguna manipulación. Al cabo de 8 días se alcanzó una MI del 90%. La fermentación se interrumpió después de la sedimentación mediante filtrado con 20 μm. En la Tabla 3 se representa el TCID₅₀ en el momento de la recolección y después de la recolección.

55

TABLA 3

TCID₅₀ en fermentación por lotes descrita a modo de ejemplo

60

| | Antes de la recolección | Después de la recolección | Volumen |
|---|-------------------------|---------------------------|---------|
| log ₁₀ (TCID ₅₀) [log ₁₀ (1/ml)] | 6,7 +/- 0,3 | 6,0 +/- 0,3 | ~ 10 L |

65

ES 2 341 352 T3

Ejemplo 4

Propagación del PPVO en la caldera de agitación de 3,5 l mediante cultivo celular con microsoportes en lotes alimentados de volumen aumentado (transferencia en reactor de 15 litros) usando un medio de cultivo que contiene proteína

La línea celular *Bovine Kidney* adaptada a condiciones libres de suero pero con contenido de proteína se cultivó, partiendo del banco de células, primero en frascos T y después en botellas rotatorias. El cultivo se llevó a cabo a 37°C y un valor de pH de 7,2 +/- 0,2 en estufa de incubación a la que se aplicó gas CO₂. La recolección del material celular se realizó mediante tripsinización.

La concentración de los microsoportes Cytodex 3 de la empresa Amersham, Suecia, preparados conforme a las instrucciones del comerciante ascendía a 5 g/l. La inoculación se llevó a cabo en 3,5 litros con un número de células de 3×10^5 1/ml. Durante la fase de cultivo celular y mediante sedimentación se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo a una concentración de glucosa $c < 0,5$ g/l. El reactor se agitó con ayuda de un agitador inducido con 45 rpm. El pO₂ se ajustó al 40% +/- 10%. El valor del pH ascendía a 7,2 +/- 0,2.

Después de 10 días se alcanzó un número de células de $7,1 \times 10^6$ 1/ml, encontrándose las células en la fase de crecimiento estacionario. Después de tres etapas de lavado con medio de cultivo sin suplementos se llevó a cabo la infección con PPVO (MI = 0,01) en 1,7 litros durante 2 h a $n = 14$ rpm antes que se llenara a 3,5 litros y las revoluciones del agitador se aumentarían a $n = 45$ rpm.

16 h después de la infección se transfirió todo el cultivo al reactor de 15 litros y se llenó con 7 litros (dilución 1:2). En el reactor de 15 litros se ajustaron los mismos parámetros.

46 h después de la infección se diluyó a 10,5 litros (dilución 1:3 referido a 3,5 l). El CPE ascendía aproximadamente al 30% referido al número de células en el reactor de 3,5 litros y teniendo en cuenta la dilución.

70 h después de la infección se aumentó el volumen a 12,5 litros antes de que finalmente 94 h después de la infección se aumentara a 13,8 litros (dilución 1:3,9).

7 días después de la infección (2,5 días después de la última dilución) se interrumpió la fermentación mediante sedimentación y posterior filtración con 20 μ m del cultivo (CPE = 93%).

En la Tabla 4 se representa el TCID₅₀ en el momento de la recolección y en la recolección.

TABLA 4

TCID₅₀ en lotes alimentados de volumen ampliado conforme a la invención

| | Antes de la recolección | Después de la recolección | Volumen |
|---|-------------------------|---------------------------|-----------|
| $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$ [$\log_{10}(1/\text{ml})$] | 7,7 +/- 0,3 | 7,6 +/- 0,3 | 14 litros |

Ejemplo 5

Propagación del PPVO en la caldera de agitación de 3,5 l mediante cultivo celular con microsoportes en lotes alimentados de volumen aumentado (transferencia en reactor de 15 litros) usando un medio de cultivo libre de proteína y libre de suero

La línea celular *Bovine Kidney* adaptada a condiciones sintéticas se cultivó, partiendo del banco de células, primero en frascos T y después en botellas rotatorias. El cultivo se llevó a cabo a 37°C y un valor de pH de 7,2 +/- 0,2 en estufa de incubación a la que se aplicó gas CO₂. La recolección del material celular se realizó mediante tripsinización.

La concentración de los microsoportes Cytodex 3 de la empresa Amersham, Suecia, preparados conforme a las instrucciones del comerciante ascendía a 5 g/l. La inoculación se llevó a cabo en 3,5 litros con un número de células de $3,8 \times 10^5$ 1/ml. Durante la fase de cultivo celular y mediante sedimentación se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo a una concentración de glucosa $c < 0,5$ g/l. El reactor se agitó con ayuda de un agitador inducido con 45 rpm. El pO₂ se ajustó al 40% +/- 10%. El valor del pH ascendía a 7,2 +/- 0,2.

ES 2 341 352 T3

Después de 13 días se alcanzó un número de células de 5,6 E06 cel./ml, encontrándose las células en la fase de crecimiento estacionario. Después de tres etapas de lavado con el mismo medio de cultivo se llevó a cabo la infección con PPVO (MI = 0,01) en 3,5 litros, n = 40 rpm.

5 20 h después de la infección se transfirió todo el cultivo al reactor de 15 litros y se llenó con 7 litros (dilución 1:2). En el reactor de 15 litros se ajustaron los mismos parámetros.

10 49 h después de la infección se diluyó a 11 litros (dilución 1:3 referido a 3,5 l). El CPE ascendía aproximadamente al 30% referido al número de células en el reactor de 3,5 litros y teniendo en cuenta la dilución.

10 69 h después de la infección se aumentó el volumen a 12,5 litros antes de que finalmente 86 h después de la infección se aumentara a 13 litros (dilución 1:3,9).

15 7 días después de la infección se interrumpió la fermentación mediante sedimentación y posterior filtración con 20 μm del cultivo (CPE = 93%).

En la Tabla 5 se representa el TCID₅₀ en el momento de la recolección y después de la recolección.

20

TABLA 5

25 *Representación del TCID₅₀ alcanzado en la la fermentación por lotes alimentados de volumen ampliado con la línea celular sintética*

25

| | Antes de la recolección | Después de la recolección | Volumen |
|---|-------------------------|---------------------------|------------|
| 30 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$ [TCID ₅₀ (1/ml)] | 7,8 +/- 0,3 | 7,4 +/- 0,3 | ~14 litros |

35

Ejemplo 6

Para obtener preparados víricos de alta pureza se usaron cosechas de virus libres de microsoportes. La propagación de los virus se llevó a cabo por ej. tal como se describe en los ejemplos 1 a 5. Primero se realizó una microfiltración cuidadosa con la cosecha de virus. Para este fin puede usarse por ej. un soporte para cassettes de la empresa Sartorius (Alemania) con un cassette de membrana de la empresa Sartorius (Alemania). De forma alternativa pueden usarse también módulos de fibra hueca de la empresa Minntech (EE.UU.) o de la empresa Pall (EE.UU.). Para la microfiltración se usan de manera preferente membranas o fibras huecas con un tamaño de poro de 0,1 μm . La etapa de microfiltración sirve para una reducción del volumen de 5 a 20 veces, el acondicionamiento del pH (de manera preferente pH 7,5 a 9,0) y el empobrecimiento de sustancias acompañantes de la fermentación de bajo peso molecular. El concentrado de virus obtenido de esta manera se inactivó químicamente con etilenimina a un pH 8,6. Para la activación de los virus se usó una concentración de etilenimina de 3 a 20 mM. La inactivación se llevó a cabo en dos etapas. La mezcla de reacción se incubó primero durante 3 a 6 h a 37°C con control del pH y a continuación se finalizó la inactivación de los virus en otro recipiente de reacción a 37°C durante la noche. Añadiendo un exceso 1,5 a 3,0 molar de tiosulfato sódico se neutralizó la suspensión de virus inactivada. A continuación de la neutralización se llevó a cabo una centrifugación a bajas revoluciones a 4.000 a 8.000 g durante 2 a 4 h. Este primer paso de purificación sirvió para separar las partículas víricas de la solución de inactivación neutralizada. Las partículas víricas inactivadas se pueden almacenar interinamente después de esta primera etapa de purificación a 2-8°C o a <-65°C hasta el posterior procesamiento. La segunda etapa de purificación puede llevarse a cabo por ej. mediante una centrifugación a bajas revoluciones usando un colchón de sacarosa del 20%. De forma alternativa se pueden usar también adsorbentes de membrana de la empresa Sartorius (Alemania) o de la empresa Pall (EE.UU.). La segunda etapa de centrifugación se realizaría a 4.000 a 8.000 g durante la noche. El balance del procedimiento de purificación se llevó a cabo por medio de fraccionamiento flujo-campo-flujo asimétrico (análisis AF4) y refractometría, así como microscopía electrónica cuantificante. En las tablas 6 y 7 se representan los desarrollos del rendimiento típicos.

60

65

ES 2 341 352 T3

TABLA 6

Balace del procedimiento de purificación descrito anteriormente por medio de fraccionamiento flujo-campo-flujo asimétrico (análisis AF4) y refractometría

| | Nº de ensayo | Etapa del proceso | Muestra | Partículas totales | Rendimiento acumulativo [%] |
|----|--------------|--------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| 5 | | | | | |
| 10 | 508623 | 3,0/0,8 µm | Inicio | 5,9E13 | 100 |
| | | Filtración de partículas | Filtrado | 2,5E13 | 42 |
| 15 | | Etapa de centrifugación | Inicio | 2,5E13 | |
| | | 1 | Sedimento | 5,5E12 | 9 |
| | | Etapa de centrifugación | Inicio | 5,5E12 | |
| 20 | 508624 | 2 | Sedimento | 3,6E12 | 6 |
| | | 3,0/0,8 µm | Inicio | 6,6E13 | 100 |
| | | Filtración de partículas | Filtrado | 2,3E13 | 35 |
| 25 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | 2,3E13 | |
| | | 1 | Sedimento | 5,9E12 | 9 |
| | | Etapa de centrifugación | Alimentación | 5,9E12 | |
| 30 | 508627 | 2 | Sedimento | 3,6E12 | 5 |
| | | 3,0/0,8 µm | Inicio | 6,6E13 | 100 |
| | | Filtración de partículas | Filtrado | 1,5E13 | 43 |
| 35 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | 1,5E13 | |
| | | 1 | Sedimento | 3,1E12 | 8 |
| 40 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | 3,1E12 | |
| | | 2 | Sedimento | 2,0E12 | 5 |
| 45 | | | | <i>Rendimiento medio</i> | 5 |

50

55

60

65

ES 2 341 352 T3

TABLA 7

Balance del procedimiento de purificación descrito anteriormente por medio de microscopía electrónica cuantificante

5

| Nº de ensayo | Etapa del proceso | Muestra | Partículas totales | Rendimiento acumulativo [%] | |
|--------------|--------------------------|--------------|--------------------|-----------------------------|----------------|
| 10 508623 | 3,0/0,8 µm | Inicio | 1,5E13 | 100 | |
| | Filtración de partículas | Filtrado | s.d. | - | |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - | |
| | 1 | Sedimento | 4,4E12 | 30 | |
| 15 508624 | Etapa de centrifugación | Alimentación | 4,5E12 | | |
| | 2 | Sedimento | 4,2E12 | 29 | |
| | 3,0/0,8 µm | Inicio | 2,4E13 | 100 | |
| | Filtración de partículas | Filtrado | s.d. | - | |
| 20 508627 | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - | |
| | 1 | Sedimento | 4,6E12 | 19 | |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | 4,6E12 | | |
| | 2 | Sedimento | 3,2E12 | 13 | |
| 25 508627 | 3,0/0,8 µm | Inicio | 7,3E13 | 100 | |
| | Filtración de partículas | Filtrado | s.d. | - | |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - | |
| | 1 | Sedimento | 2,3E12 | 31 | |
| 30 508627 | Etapa de centrifugación | Alimentación | 2,3E12 | - | |
| | 2 | Sedimento | 3,5E12 | 49 | |
| | | | | <i>Rendimiento medio</i> | <i>13 - 48</i> |

45

Mediante un ensayo de proteína de las células huésped específico se determinó el contenido de proteína en las células huésped en etapas del proceso seleccionadas y se usó para la determinación de los factores de empobrecimiento. En la tabla 8 se representan los resultados de empobrecimiento típicos.

50

55

60

65

ES 2 341 352 T3

TABLA 8

Empobrecimiento de proteínas de las células huésped en el curso de la purificación de virus

| Nº de ensayo | Etapa del proceso | Muestra | Contenido de HCP [$\mu\text{g}/1\text{E}10$ PV] | Empobrecimiento to HCP acumulativo |
|--------------|--------------------------|----------------|--|------------------------------------|
| 508623 | 3,0/0,8 μm | Prefiltración | 58 | - |
| | Filtración de partículas | Postfiltración | s.d. | - |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - |
| | 1 | Sedimento | 3,5 | 17 |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | 3,5 | - |
| | 2 | Sedimento | 3 | 19 |
| 508624 | 3,0/0,8 μm | Prefiltración | 80 | - |
| | Filtración de partículas | Postfiltración | s.d. | - |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - |
| | 1 | Sedimento | 4,8 | 17 |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | 4,8 | - |
| | 2 | Sedimento | 5 | 16 |
| 508627 | 3,0/0,8 μm | Prefiltración | 187 | - |
| | Filtración de partículas | Postfiltración | s.d. | - |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | s.d. | - |
| | 1 | Sedimento | 14 | 13 |
| | Etapa de centrifugación | Alimentación | 14 | - |
| | 2 | Sedimento | 14 | 13 |
| | | | <i>Empobrecimiento medio</i> | <i>13 - 19</i> |

La prueba de la pureza microbiana se llevó a cabo con los procedimientos estándar habituales. Pudo demostrarse que el procedimiento de purificación antes descrito puede llevarse a cabo en condiciones asépticas.

ES 2 341 352 T3

TABLA 9

Evaluación de la pureza microbiana

| 5 | Nº de ensayo | Etapa del proceso | Muestra | Carga bacteriana biológica (bioburden) [recuentos/ml] | |
|----|---------------------|--|-------------------------|---|-----|
| 10 | 508623 | 3,0/0,8 µm Filtración de partículas | Inicio | 0/0 | |
| | | | Filtrado | 0/0 | |
| 15 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | - | |
| | | 1 | Sedimento | 0/0 | |
| 20 | 508624 (02KUR02) | 3,0/0,8 µm Filtración de partículas | Etapa de centrifugación | Alimentación | |
| | | | 2 | Sedimento | 0/0 |
| 25 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | - | |
| | | 1 | Sedimento | 0/0 | |
| 30 | 508623 (02KUR05) | 3,0/0,8 µm Filtración de partículas | Etapa de centrifugación | Alimentación | |
| | | | 2 | Sedimento | 0/0 |
| 35 | | Etapa de centrifugación | Alimentación | - | |
| | | 1 | Sedimento | 0/0 | |
| 40 | 508623 (02KUR05) | 3,0/0,8 µm Filtración de partículas | Etapa de centrifugación | Alimentación | |
| | | | 2 | Sedimento | 0/0 |
| 45 | | | Etapa de centrifugación | Alimentación | - |

50 A continuación de la segunda etapa de purificación se formuló la preparación vírica de alta pureza usando microfiltración. Para esta etapa de formulación se pueden usar membranas de la empresa Sartorius (Alemania) o de la empresa Pall (EE.UU.), así como fibras huecas de las empresas Minntech (EE.UU.) o Amersham Biosciences (EE.UU.). El tamaño de poro preferido se encuentra en 0,1 µm. El objetivo de esta etapa de formulación es acondicionar la suspensión de virus en lo que respecta al valor del pH, la osmolaridad y el contenido de partículas. Tras la adición de un estabilizador apropiado (1-5% de poligelina) se puede liofilizar el preparado vírico preparado de esta manera con fines de almacenamiento a largo plazo. Antes de su uso como medicamento hay que mezclar el liofilizado según el volumen de partida con WO (agua para solución inyectable) estéril y libre de pirógenos. La preparación de virus preparada por medio del procedimiento descrito anteriormente es adecuada para la aplicación por vía parenteral.

60 En la tabla 10 se recopilan resultados típicos de la caracterización de los preparados víricos formulados antes de la liofilización.

65

ES 2 341 352 T3

TABLA 10

Análisis de la suspensión de virus formulada antes de la liofilización

| 5 | Parámetros | 508623 | 508624 | 508627 |
|----|--|----------------|---------------|---------------|
| | Contenido de partículas mediante AF4/RI [PV/ml] | 1,8E10 | 2,0E10 | 1,0E10 |
| | Contenido de partículas mediante microscopía electrónica cuantificante [PV/ml] | 4,1E10 | 3,58E10 | 2,5E10 |
| 10 | Actividad biológica (ratón HBV transgénico) | se corresponde | | |
| | Carga bacteriana biológica (bioburden) [recuentos/ml] | 0 | 0 | 0 |
| | Contenido de endotoxinas [UE/ml]* | 6 | 6 | 2,4 |
| 15 | Contenido de proteína de las células huésped [µg/ml] | 4,7 - 6,4 | 8,6 - 9,3 | 9,9 - 13,3 |
| | Contenido de ácidos nucleicos [ng/ml] | 3,7 | 2,9 | 1,6 |

*: el estabilizador de virus usado tiene ya un contenido de endotoxina medio de 2 a 8 UE/ml.

20 Patentes

- US 6,455,298
- 25 US 6,656,720
- US 5,994,134
- US 5,719,051
- 30 US 6,194,210
- US 6,726,907
- 35 WO 95/24468

Bibliografía

- 40 **AMERSHAM**, "Microcarrier Cell Culture- Principals and Methods", *Manual Amersham Pharmacia*, Suecia, 2001
- B. BAIJOT, M. DUCHENE, J. STEPHENNE**, "Production of Aujesky Vaccine by the Microcarrier Technology", *Devel. Biol. Standard.*, 66, 523-530, 1987
- 45 **M. P. DÜRRSCHMID, K. LANDAUER, G. SIMIC, H. KLUG, T. KEIJZER, F. TRAMPLER, A. OUDS-HOORN, M. GRÖSCHL, D. MÜLLER, O. DOLBHOFF-DIER**, "Comparison of Fluidized Bed and Ultrasonic Cell Retention Systems for High Cell Density Mammalian Cell Culture", *Biotechnol. Prog.*, 19, 1045-1048, 2003
- 50 **M. P. DÜRRSCHMID, K. LANDAUER, G. SIMIC, G. BLÜML, O. DOLBHOFF-DIER**, "Scaleable Inoculation Strategies for Microcarrier Based Animal Cell Bioprocesses", *Biotechnol. And Bioeng.*, 83, No. 6, 2003
- M.W. GLACKEN, R.J. FLEISCHAKER, A.J. SINSKEY**, "Large Scale Production of Mammalian Cells and Their Products", in *Annals New York Academy of Sciences*, 355-372, 1989
- 55 **J. B. GRIFFITHS, D.R CAMERON, D. LOBBY**, "A Comparison of Unit Process Systems for Anchorage Dependet Cells", *Devel. Biol. Standard.*, 66, 331-338, 1994
- E. LINDNER, A.-C. ARVIDSSON, I. WERGELAND, D. BILLIG**, "Subpassaging Cells on Microcarriers", *Devel. Biol. Standard.*, 66, 299-305, 1987
- 60 **MERTEN, O.W., KIERULFF J.V., CASTINGOLLES, N., PERRIN, P**, "Evaluation of the new serum free medium (MSDSS2) for the production of different biologicals: Use of various cell lines", *Cytotechnol.*, 14, 47-59, 1994
- 65 **B.J. MONTAGNON, B. FANGET, J.C: VINCENT-FALQUET**, "Industrial Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of Vero Cells on Microcarrier" *Rev. Of Inf. Diseases.*, 6, Supplement 2, 1984

ES 2 341 352 T3

B.J. MONTAGNON, J.C: VINCENT-FALQUET, B. FANGET, “Thousand Litre Scale Microcarrier Culture of Vero Cells for Killed Polio Viruses Vaccine”, *Devel. Biol. Standard.*, 55, 37-42, 1984

5 M. REITER, F. WEIGANG, W. ERNST, “High Density Microcarrier Culture with a New Device which Allows Oxygenation and Perfusion of Microcarrier Cultures” *Cytotechnology*, 3, 39-42, 1990

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de material vírico en un cultivo celular con microsoportes, que comprende

- 5
- (a) una primera fase de cultivo que comprende un aumento del volumen del cultivo celular mediante la adición de medio de cultivo y material de microsoporte, alcanzándose un primer volumen de cultivo celular máximo;
 - 10 (b) una etapa de infección que tiene lugar después de la mencionada primera fase de cultivo y que comprende la adición de material vírico infeccioso al mencionado cultivo celular con microsoportes;
 - (c) una segunda fase de cultivo que tiene lugar después de la mencionada etapa de infección y que comprende un aumento adicional del volumen del cultivo celular hasta un segundo volumen de cultivo celular máximo, generándose material vírico durante la segunda fase de cultivo; y
 - 15 (d) una etapa de recolección para obtener el material vírico a partir del cultivo celular con microsoportes,

caracterizado porque

20 el mencionado segundo volumen de cultivo máximo es de dos a siete veces mayor que el mencionado primer volumen de cultivo máximo.

25 2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, siendo el mencionado segundo volumen de cultivo máximo de tres a cuatro veces mayor que el mencionado primer volumen de cultivo máximo.

3. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 o 2 en el que el mencionado aumento del volumen del cultivo celular se consigue mediante la adición de medio de cultivo no concentrado.

30 4. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que se usa un medio de cultivo libre de suero.

5. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que en la etapa de infección se usa una multiplicidad de infección (MI) de 0,001 a 2.

Fig. 1

