

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 311**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2015 PCT/US2015/046927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16048556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2015 E 15845303 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3198003**

54 Título: **Sembrar un biorreactor de células adherentes con células no adherentes aumenta el límite de densidad de siembra y reduce el tiempo de expansión requerido**

30 Prioridad:

26.09.2014 GB 201417042

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

14.11.2024

73 Titular/es:

**TRIZELL LTD. (100.0%)
Drayton Hall, Church Road
West Drayton, UB7 7PS, GB**

72 Inventor/es:

**LESCH, HANNA, P.;
KARHINEN, MINNA;
HASSINEN, MINNA;
SHAW, ROBERT;
PARKER, NIGEL;
YLA-HERTTUALA, SEPPO;
MALINEN, JOONAS y
LIPPONEN, EEVI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 987 311 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

Sembrar un biorreactor de células adherentes con células no adherentes aumenta el límite de densidad de siembra y reduce el tiempo de expansión requerido

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de Gran Bretaña nº de serie 1417042.7 presentada el 25 de septiembre de 2014.

Campo

10 Hemos encontrado una forma contraintuitiva de mejorar la producción a escala comercial de productos biológicos recombinantes en biorreactores de células adherentes. Nuestro enfoque reduce el riesgo de contaminación del cultivo celular, aumenta el rendimiento total y reduce el retraso entre la siembra y la cosecha, minimizando así la degradación del producto de expresión.

Antecedentes

15 Hasta la fecha, sólo existe un producto de terapia génica aprobado, Glybera®, que contiene un virus adenoasociado para el tratamiento de una rara deficiencia familiar de lipoproteína lipasa (Salmon et al. 2014). Sin embargo, un amplio espectro de aplicaciones de terapia génica muestra potencial para el desarrollo y la comercialización futuros. Hasta ahora, alcanzar dosis para los pacientes de 10^{12} - 10^{13} partículas virales (pv) para ensayos clínicos a menor escala ha demostrado ser un obstáculo difícil, y la fabricación a gran escala de vectores virales para suministro comercial (es decir, $\geq 10^{16}$ pv) sigue siendo un reto. El reto de fabricación fue revisado recientemente por (Vellinga et al. 2014).

20 La gama de líneas celulares productoras es amplia. Las células para cultivo *in vitro* son de dos tipos generales: células adaptadas a vivir adheridas a un sustrato sólido, y células adaptadas a vivir en suspensión en un medio líquido. Las líneas celulares adherentes incluyen, por ejemplo, HEK293 (y derivados como las células 293T y 293FT), CEF, MDBK, A549 y Vero. Estas se han usado para la producción de diferentes productos biológicos tales como adenovirus, MVA, virus del herpes bovino, AAV o virus de la gripe (Knowles et al. 2013).

25 No todas las células pueden cultivarse eficientemente en suspensión, y además, algunas células en condiciones adherentes han mostrado una mayor productividad del vector específico (Iyer et al. 1999). Por lo tanto, se requiere una ampliación eficiente de los sistemas de producción adherentes. La forma tradicional de cultivar células adherentes es en un matraz, y estos pueden variar en tipo (por ejemplo, matraces T, frascos giratorios, Cell Stacks, Hyper Stacks o Cell Factories). La producción mejorada en matraces está limitada por el espacio de producción
30 requerido, no es práctico de manipular, y las múltiples unidades dificultan la monitorización/control de las condiciones de cultivo.

35 Hay diferentes tipos de vehículos o sustratos disponibles para uso en biorreactores de cultivo celular adaptados para adherentes. Por ejemplo, los microsoportes de tipo perla (por ejemplo, Cytodex, GE Healthcare) flotan libremente en suspensión en un medio. Los soportes de tipo matriz (por ejemplo, discos Fibra-cell, Eppendorf) consisten en fibras de poliéster, opcionalmente mantenidas dentro de una jaula (por ejemplo, de polipropileno) para inmovilizar las fibras. Aquí usamos los términos "soporte" y "sustrato" para referirnos a cualquier material en estado sólido usado para proporcionar una superficie sobre la cual las células adherentes pueden adherirse en cultivo.

40 Se han probado microsoportes de tipo perla en biorreactores (Wu et al. 2002), proporcionando el microsoporte un sustrato para el crecimiento de células adherentes mientras se dispersa en el medio de cultivo celular. Sin embargo, estos sistemas no han resultado fáciles de manipular, y no garantizan un crecimiento homogéneo. Otra limitación ha sido la expansión de una gran masa celular en los vasos estáticos con una escalabilidad limitada. También necesitan operaciones que requieren mucha mano de obra para separarlos del vector más adelante en el procedimiento (Dormond et al. 2009).

Los retos en productividad son

- 45
1. Falta de sistemas de producción automáticos controlados
 2. Baja productividad de una sola célula, lo que aumenta el número/volumen de las células
 3. Falta de sistemas de biorreactores a gran escala para respaldar una alta productividad
 4. Falta de sistemas de biorreactores desechables para evitar etapas exigentes de limpieza y esterilización en GMP

5. Retos en las estrategias de alimentación funcional (por ejemplo, bloqueo de la membrana de perfusión durante el cultivo de células en suspensión)

6. La masa celular (densidad celular) no es suficiente para respaldar una producción de alto rendimiento (etapa de expansión celular)

5 7. Bajo rendimiento total por lote

8. Agregación/precipitación durante el procedimiento aguas abajo

10 El uso de biorreactores de cultivo de células adherentes con lecho de fibras empaquetadas ha proporcionado un sistema perfusible controlado opcional con bajo estrés de cizallamiento (Meuwly et al. 2007). El biorreactor iCELLis® (disponible comercialmente de Artelis SA (París, Francia) / Advanced Technology Materials Inc. (Bruselas, Bélgica) / Pall Corporation (Fall River, Massachusetts) representa un biorreactor de lecho fijo desarrollado para cultivos de células VERvert Origin (VERO) adherentes escalables. iCELLis es un biorreactor compacto de lecho fijo de un solo uso con un soporte hecho de fibras de poliéster. El sistema comercial iCELLis varía entre 0,53 y 500 m², teniendo dos densidades de compactación diferentes de los soportes (Knowles et al. 2013). Estos biorreactores se han usado para diferentes tipos de sistemas de procesos de células adherentes. Estos incluyen el uso de diferentes líneas celulares, tales como HEK293, CEF, MDBK, A549 y Vero, y para la producción de diferentes productos biológicos, tales como adenovirus, MVA, virus del herpes bovino, AAV o virus de la gripe (Knowles et al. 2013) (Lennaertz et al. 2013).

20 Aunque los sistemas de cultivo de células adherentes de gran capacidad proporcionan un sistema de producción teóricamente atractivo, la expansión de la masa celular antes de la carga inicial para un biorreactor de cultivo adherente a gran escala puede convertirse en un obstáculo importante durante el procedimiento. Se ha calculado que se necesitaron 15 frascos giratorios de 1700 cm², o 30 veces frascos giratorios de 850 cm², para cargar células Vero en un biorreactor de cultivo adherente que proporcionara 500 m² de área de cultivo de células adherentes (Knowles et al. 2013). Sin embargo, la densidad de siembra depende de la línea celular, y debe desarrollarse para cada procedimiento individual. Cuando usaban células 293T, la densidad de carga era 25 veces mayor (80.000 células/cm²) (Lennaertz et al. 2013), lo que significa que para inocular un biorreactor de cultivo adherente que proporcionara 500 m² de área de cultivo celular adherente, habrían requerido 4×10^{11} células expandidas aproximadamente en 1500-2000 frascos giratorios. Usamos menos células para la inoculación, y calculamos que la producción en un sistema de biorreactor de lecho fijo de 500 m², el área de cultivo es igual a 6000 frascos giratorios de 850 cm², cuando se necesitan alrededor de 500 frascos giratorios para la expansión de la masa celular adecuada (en cierto modo depende de la densidad celular inoculada). Los cálculos estándar que usan la misma densidad celular que un matraz estándar de 175 cm² para la fase de inoculación muestran que la expansión de la masa celular para un biorreactor de lecho fijo de 500 m² requeriría alrededor de 2000 matraces T de 175 cm².

35 Además, un gran número de matraces resulta caro de adquirir y montar. La transferencia de células adherentes desde un gran número de matraces a un biorreactor puede resultar difícil debido a que un operador debe tratar cada matraz individualmente con, por ejemplo, tripsina para retirar las células adherentes del matraz. Cuanto mayor sea el número de matraces, mayor será el riesgo de que uno de ellos se contamine. Cuando el contenido de numerosos matraces T se combina en un solo biorreactor, esa contaminación podría destruir toda la producción. Por lo tanto, el uso de una gran cantidad de matraces para expandir las células adherentes se ha considerado inviable en la fabricación de productos biológicos de calidad comercialmente aceptable.

40 Actualmente se usan comúnmente tanto métodos adherentes como de suspensión para la producción de vectores virales (Kamen y Henry 2004; Segura et al. 2007). Anteriormente también hemos producido diferentes vectores virales usando una variedad de sistemas de cultivo celular adaptados a la suspensión (por ejemplo, el biorreactor de suspensión en bolsa de polipropileno de la marca Cultibag® y el biorreactor de cultivo celular en suspensión en tanque agitado Mobius CellReady® que usa células adaptadas a la suspensión, o matraces que usan sistemas de cultivo de células adaptadas a la suspensión. Un producto de adenovirus recombinante tipo 5 particular tiene baja productividad en células en suspensión (<15.000 pv/célula), mientras que en el sistema de producción adherente tradicional la productividad es alta (>50.000 pv/célula). Hasta ahora, el aumento de escala de un sistema adherente no ha sido posible de manera económicamente viable. Por ejemplo, un biorreactor de cultivo adherente que proporciona 500 m² de área de cultivo de células adherentes sobre un soporte de fibra de poliéster ofrece ahora una posibilidad de aumento de escala, pero el uso de tal sistema adherente no es posible debido a la necesidad de centenares de matraces triples o frascos giratorios para los requisitos de siembra a gran a escala. Por tanto, la expansión celular, como parte del sistema adherente, es un obstáculo importante.

55 Si bien tales retos inhiben la adopción de sistemas adherentes para la fabricación a escala comercial, si estos retos pudieran superarse, un sistema adherente ofrecería una ventaja crítica: las células adherentes producen más partículas virales que las células en suspensión. Por lo tanto, aunque se encuentran disponibles varios enfoques de suspensión para la producción de vectores virales, una línea celular adherente podría proporcionar una ventaja crucial en la fabricación a escala comercial debido a que la productividad del vector viral en células adherentes

puede ser mucho mayor que en suspensión. Por tanto, aunque la técnica anterior, por muchas razones, desaconseja el uso de suero fetal bovino, hemos descubierto que la adición de suero fetal bovino puede aumentar significativamente la productividad del vector viral. Este fenómeno parece deberse al contenido de lípidos del suero fetal bovino, cuyos lípidos pueden ser un componente clave durante la producción de vectores virales (especialmente vectores virales con cubierta) para aumentar el rendimiento y la estabilidad del vector resultante. Además, ciertas líneas celulares no se pueden cultivar en modo de suspensión, por lo que poder usar productivamente estas líneas en la fabricación a escala comercial requiere encontrar una manera de adaptar el cultivo adherente a la fabricación a escala comercial. El documento US4833083 analiza biorreactores de lecho empaquetado. El documento EP1760151 analiza composiciones de adenovirus que se pueden obtener mediante un método de producción y purificación. El documento WO02074940 analiza métodos para extraer virus de cultivos celulares. El documento WO2011112601 analiza biorreactores de flujo continuo para cultivo de tejidos tridimensionales estabilizados magnéticamente. Graham et al. (2002) *The Scientific World Journal*, 2: 1630-1633 analizan la homogeneización de células cultivadas de mamíferos. Chang et al. (1981) *Anal. Biochem.*, 116(2): 298-302 analizan un procedimiento simple y eficiente para la rápida homogeneización de células animales cultivadas que se hacen crecer en monocapa. Rajendran et al. (2014) *AMB Express*, 4: 25 analizan una evaluación de sistemas de biorreactores de lecho empaquetado en la producción de vacunas virales. Jordan et al. (2004) *Methods*, 33(2): 136-43 analizan la transfección de células adherentes y suspendidas mediante fosfato cálcico. Lesch et al. (2015) *Hum Gene Ther*, 26(8): 560-71 analizan el desarrollo del procedimiento de producción de vectores adenovirales en un biorreactor de lecho fijo. Cellculturedish.com publicó un artículo en 2018 dirigido al uso de biorreactores de lecho fijo en cultivos de células adherentes.

Por consiguiente, cuando se usan tales biorreactores y crecimiento celular en modo adherente, existe la necesidad en la técnica de un medio eficaz de expansión celular para obtener la masa celular inicial requerida para la carga inicial del biorreactor.

Sumario

La técnica enseña a sembrar biorreactores de células adherentes con células adaptadas al cultivo adherente. Probamos exactamente el enfoque opuesto, e intentamos sembrar un biorreactor de células adherentes con células adaptadas a la suspensión. Sorprendentemente, descubrimos que no sólo las células adaptadas a la suspensión se adhieren al sustrato en el biorreactor adherente, sino que esas células adaptadas a la suspensión prosperan cuando se cultivan en modo adherente, y el uso de células adaptadas a la suspensión permite reducir en gran medida la cantidad de células necesarias para siembra, y evita obstrucciones del sustrato o soporte. Por tanto, la presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que las células adaptadas a la suspensión (expandidas en cultivo en suspensión) se pueden inocular con éxito en un biorreactor de cultivo adherente, y posteriormente cultivarse en modo adherente. Esto supera el problema de que actualmente no existen medios comercialmente viables para expandir las células, a fin de alcanzar la masa celular requerida para la carga de biorreactores a escala comercial que usan células adherentes.

Este enfoque va en contra de la práctica común, en la que se piensa que las células deberían expandirse en modo adherente antes de su uso en sistemas de producción adherentes. De hecho, el uso de células en suspensión no adherentes para la expansión va en contra de las instrucciones y recomendaciones expresas de al menos un fabricante de biorreactores de cultivo adherente (Advanced Technology Materials Inc. (Bruselas, Bélgica) / Pall Corporation (Fall River, Massachusetts)).

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de un producto biológico recombinante, que comprende: (a) obtener células que se han expandido en modo de suspensión; y (c) inocular las células en un biorreactor que tiene un soporte de fibras empaquetadas que proporciona un área superficial para el cultivo de células adherentes; y después (d) exponer las células a un factor que promueve la adherencia, seleccionado del grupo que consiste en: suero fetal bovino, colágeno, fibronectina, laminina, iones de calcio, proteoglicanos, y polisacáridos de la ECM, en una cantidad eficaz para promover la adherencia, por lo que las células se adhieren a dicho soporte de fibras empaquetadas en dicho biorreactor

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de células adaptadas a la suspensión en un método para la producción de un producto biológico recombinante; en el que dichas células adaptadas a la suspensión se han expandido en un cultivo celular en suspensión; y en el que el método comprende inocular las células expandidas obtenidas del cultivo en suspensión en un biorreactor que tiene un soporte de fibras empaquetadas, y después exponer las células a un factor que promueve la adherencia, seleccionado del grupo que consiste en: suero fetal bovino, colágeno, fibronectina, laminina, iones de calcio, proteoglicanos, y polisacáridos de la ECM, en una cantidad eficaz para promover la adherencia, mediante lo cual después de inocular las células, las células se adhieren al soporte de fibras empaquetadas en el biorreactor, y las células expandidas se cultivan en modo adherente para producir el producto biológico recombinante.

Nuestro enfoque contrario a la intuición proporciona una nueva manera de reducir en gran medida la necesidad de procesamiento posterior de productos de expresión que requieren lisis de células hospedantes para su aislamiento y

purificación, particularmente productos de líneas celulares productoras adaptadas a la suspensión. Para los productos que requieren lisis de las células productoras, un biorreactor de lecho fijo funciona como un filtro o "preclarificación" cuando una gran cantidad de desechos celulares permanecen adheridos o son filtrados por el sustrato de cultivo de células adherentes del lecho fijo, y la carga para aguas abajo es por tanto notablemente menos. Observamos que el material recolectado es bastante transparente en comparación con el material recolectado de biorreactores de tipo suspensión después de la lisis celular. La digestión del ADN celular fuera del biorreactor impidió la agregación del virus ya que no se detectó ninguna agregación. Vimos el mismo fenómeno si el tratamiento con Benzonase se realizó antes y después de la lisis química de la célula productora dentro del biorreactor seguido de la adición de un amortiguador con alto contenido de sal.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento que muestra las etapas típicas involucradas en el uso de nuestro procedimiento para producir un vector viral de terapia génica en un biorreactor de cultivo adherente marca iCELLis™.

15 La Figura 2 muestra los resultados típicos de nuestro procedimiento que usa un biorreactor de cultivo adherente de la marca iCELLis Nano™ después de expandir las células en modo de suspensión, inocular las células adaptadas a la suspensión en un biorreactor de cultivo adherente de la marca iCELLis Nano™, y después hacer crecer las células en modo adherente. a) Curvas de crecimiento de células HEK293. b) Curva de crecimiento de células 293T. El consumo de glucosa y la acumulación de lactato se correlacionaron con el crecimiento celular.

20 La Figura 3 es una imagen de microscopía fluorescente de células 293T 24 h después de la transfección con fosfato cálcico para la producción de AAV2 que expresa proteína fluorescente verde (GFP). Las células 293T se expandieron en suspensión, se inocularon en el biorreactor de 4 m² marca iCELLis Nano™, y se cultivaron en modo de adherencia durante la expresión de AAV.

Figura 4. Prueba del efecto de diferentes concentraciones de Benzonase y tiempos de inoculación para la eliminación del ADN del material de adenovirus recolectado.

25 Figura 5. Turbidez frente al tiempo para diversas muestras de recolección de virus.

Descripción detallada

1. Línea celular productora

Además, según dichos primer y segundo aspectos, las células para uso en la invención pueden comprender aquellas de cualquier línea celular productora adecuada, dependiendo del producto biológico recombinante deseado, por ejemplo cualquier línea celular productora eucariota (por ejemplo, línea celular de mamífero inmortalizada, o línea celular de insecto). Preferiblemente, esta línea celular se selecciona del grupo que consiste en HEK293, 293T, o cualquier línea celular relacionada con HEK293, células HT-1080, HepG2, A549, CHO, BHK, Sf9, Sf21, NCL, UR, N52.E6, BTI-Tn 5. B 1-4, COS, NIH/3T3, Vero, NSO, NCST11, PerC6 o Her; o combinaciones o modificaciones de las mismas. Sin embargo, las células HEK293 y 293T son más preferibles; y además son preferidas especialmente cuando el producto biológico recombinante es un vector viral.

2. Tipo de biorreactor adherente

Además, según dichos primer y segundo aspectos, es preferible que el biorreactor comprenda al menos uno, más preferiblemente una pluralidad de soportes sobre los que se pretende que se adhieran las células expandidas, que pueden estar flotando o fijados en el biorreactor. Preferiblemente, dichos soportes se pueden fabricar, por ejemplo, usando politereftalato de etileno, poliestireno, poliéster, polipropileno, DEAE-dextrano, colágeno, vidrio, alginato o acrilamida. Los biorreactores adecuados que se pueden usar incluyen aquellos que contienen microsoportes de tipo perla (por ejemplo, perlas de la marca Cytodex®, disponibles comercialmente de la división GE Healthcare Inc. de General Electric Corp.) y soportes de tipo matriz (por ejemplo, discos de la marca Fibra-cell™, disponibles comercialmente de Eppendorf Corp.). Se prefiere especialmente que el biorreactor use un soporte de fibra de poliéster, tal como el usado en los biorreactores iCELLis® nano o iCELLis® 500 (disponibles comercialmente de Advanced Technology Materials Inc. (Bruselas, Bélgica) y Pall Corporation (Fall River, Massachusetts)).

3. Métodos de expansión en suspensión

Además, según dichos primer y segundo aspectos, es preferible que el cultivo en suspensión comprenda el uso de un método de expansión de tipo matraz, o un biorreactor adicional en el que las células se expandan en modo no adherente (suspensión). El método de expansión en suspensión de tipo matraz puede ser cualquiera disponible en la técnica, usando cualquier tipo de matraz de cultivo celular adecuado para la expansión celular en suspensión constante o mixta/agitada usando, por ejemplo, un matraz T, un frasco giratorio, un matraz giratorio o un matraz agitador; o combinaciones de los mismos. De manera similar, el biorreactor adicional puede ser cualquiera disponible

en la técnica en el que las células se expandan en suspensión, por ejemplo cualquier tipo de biorreactor por lotes, por lotes alimentado, o continuo, de un solo uso o de usos múltiples, de tanque agitado o de tipo onda, biorreactor de tipo perfusión o recirculación; o combinaciones de los mismos. El método exacto de cultivo en suspensión no es crítico para la invención. El factor limitante para el crecimiento en cualquier cultivo en suspensión es la concentración de células en el medio (y no el área superficial, como ocurre con los cultivos de células adherentes). Por consiguiente, el uso de cualquier cultivo en suspensión adecuado, cuando lo realiza un experto, permitirá alcanzar una masa celular mayor que un cultivo adherente de una escala similar, que después se puede usar para cargar un biorreactor (y el posterior cultivo en modo adherente). Los medios adecuados para la expansión celular en cultivo en suspensión también serán evidentes para el experto. Por ejemplo, para el crecimiento de células HEK293, se pueden usar medios de cultivo CD293, BHK, Ex-cell GTM3, Freestyle o Hyclone SFM293 en una realización preferida, a modo de ejemplo y sin limitación, se puede usar medio Ex-Cell (disponible de Sigma Aldrich Co. LLC) en métodos de expansión de tipo matraz o basados en biorreactor (detallados anteriormente), que contienen contengan L-glutamina (por ejemplo, en una concentración de 6 mM); tal medio carece de calcio y otros componentes necesarios para la unión celular, promoviendo así la adaptación a la suspensión de las células. Aunque no se prefiere para la fabricación de cGMP, se puede incluir penicilina/estreptomicina, por ejemplo en una concentración de alrededor de 50 µg/ml, para evitar la contaminación. Preferiblemente, las células adaptadas a la suspensión en (a), del primer y segundo aspectos de la invención, se expanden en un medio de crecimiento que está sustancialmente libre de (es decir, que no comprende más que niveles traza de) iones de calcio, suero fetal bovino (FBS), fibronectina, colágeno, laminina, o proteoglicanos o polisacáridos no proteoglicanos de la matriz extracelular que apoyarían el anclaje de las células.

4. Inoculación

Además, según dichos primer y segundo aspectos, se prefiere especialmente que el medio que contiene las células expandidas durante/después de la inoculación en (b) comprenda factores que promuevan la adherencia celular, preferiblemente a los soportes del biorreactor (véase el párrafo más abajo), por ejemplo FBS, fibronectina, colágeno, laminina, iones de calcio, o proteoglicanos o polisacáridos no proteoglicanos de la matriz extracelular; o combinaciones de los mismos. Se puede añadir FBS (u otro factor para promover la adherencia) al medio de cultivo justo antes, durante o después de la inoculación de las células en suspensión en el biorreactor. A modo de ejemplo y sin limitación, se puede usar el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (como es conocido por el experto), que contiene FBS (por ejemplo entre 2 y 20 % en peso del medio, preferiblemente entre 5 y 15 %, por ejemplo 10 %), L-glutamina (por ejemplo a una concentración de 2 mM) Se realizará la inoculación del biorreactor con una cantidad eficaz de células expandidas en suspensión, variando dicha cantidad dependiendo del biorreactor a usar. A modo de ejemplo y sin limitación, cuando se usa un biorreactor iCELLis® nano de 4m², se pueden usar entre 1×10⁸ y 1×10⁹, preferiblemente entre 3×10⁸ y 7×10⁸, más preferiblemente entre 4×10⁸ y 6×10⁸ células, por ejemplo 5,2×10⁸ células, obtenidas de la etapa de expansión, o una densidad de células equivalente si se usa cualquier otro tamaño del biorreactor adherente. Dichas células se pueden centrifugar para obtener un pelete celular, y se pueden suspender en un volumen apropiado de medio de crecimiento (por ejemplo, 100-300 ml, por ejemplo 200 ml) como se define a continuación, antes de la inoculación, por ejemplo en el biorreactor adherente iCELLis® nano. También es posible añadir células al biorreactor directamente desde el cultivo en suspensión como se define más abajo. Por ejemplo, usando medio Excell durante la expansión celular, éste se puede conectar directamente al biorreactor que contiene, por ejemplo, DMEM con o sin FBS. Se demostró que la pequeña cantidad de medio de suspensión no afectará el anclaje celular. Por consiguiente, las células en cultivo en suspensión se pueden transferir al biorreactor de cultivo adherente mediante cualquier medio adecuado, incluida la transferencia directa o mediante transferencia indirecta. Por ejemplo, las células se pueden transferir directamente desde la vasija del reactor de suspensión, por ejemplo una bolsa de cultivo en suspensión de polipropileno Cultibag™, a un biorreactor adherente. Este es un avance práctico importante en comparación con los sistemas de expansión de tipo matraz actuales, en los que se requieren varias etapas de manipulación, como el desprendimiento de las células de los matraces (o soportes), etapas de manipulación las cuales aumentan tanto el coste como el riesgo de contaminación. Esto demuestra aún más la idoneidad del método de fabricación para la producción comercial.

5. Condiciones de infección/transfección/transducción

Dependiendo del producto en cuestión, variará la etapa del método en la que se introduce el producto biológico recombinante en las células productoras, y en qué forma. Por ejemplo, se puede introducir una proteína recombinante en la célula productora como un polinucleótido codificante (usando métodos estándar disponibles en la técnica), lo que se realizará antes de la expansión y el cultivo. Por el contrario, se puede introducir un vector viral mediante la infección de células ya expandidas, dentro del biorreactor. Las líneas celulares estables contienen elementos relacionados con el producto, y la producción puede continuar o se puede usar alguna activación/regulación del promotor. Las variaciones necesarias en el método, del tipo detallado anteriormente, serán evidentes para el experto, dependiendo del producto biológico recombinante que se vaya a producir.

Sin embargo, se prefieren especialmente los vectores virales, y su producción mediante transducción, transfección o infección, de células expandidas dentro del biorreactor. La transducción se puede realizar introduciendo ADN extraño en una célula mediante un vector viral o un virus, para producir el producto biológico recombinante. La transfección

requiere el uso de uno o más plásmidos que codifican los elementos necesarios para la producción de vectores virales, y puede realizarse mediante métodos convencionales en la técnica, incluyendo transfección, electroporación, compresión celular, sonoporación (métodos no químicos) o reactivos de transfección (métodos químicos), tales como fosfato cálcico o lípido catiónico tal como PEI. La infección es el método preferido de producción de vectores virales, y se puede lograr mediante varios métodos disponibles en la técnica. Hemos usado una multiplicidad de infección (MOI) de hasta alrededor de 400 partículas de virus/célula, pero se puede usar otra MOI adecuada. A modo de ejemplo y sin limitación, para un biorreactor adherente tal como el iCELLis® nano, el producto farmacéutico del vector viral se puede añadir al medio de crecimiento (por ejemplo, 500-1500 ml, preferiblemente 600-1200 ml, por ejemplo 800 ml de medio de crecimiento) y hacer circular en lugar de medio gastado o usando perfusión. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, las células se pueden infectar/transfectar/transducir cuando se encuentran en su fase de crecimiento exponencial en el biorreactor, por ejemplo para células HEK293 o relacionadas con HEK293 (por ejemplo, 293T) a una densidad celular de 100.000-300.000 células/cm², preferiblemente 150.000-250.000 células/cm², más preferiblemente 170.000-230.000 células/cm²; aunque también se pueden buscar densidades celulares más altas (por ejemplo, >300 000 células/cm²) para la infección.

6. El producto

Según dichos primer y segundo aspectos, el producto biológico recombinante puede ser cualquiera que se sepa en la técnica que es adecuado para la producción en un biorreactor que usa células adherentes. Dicho producto no tiene por qué limitarse específicamente a un vector viral, dado que la invención se basa en la inoculación exitosa de células expandidas en suspensión a, y su posterior adherencia sobre, el biorreactor. Además, según dichos primer y segundo aspectos, preferiblemente el producto biológico recombinante es un vector viral, una partícula similar a un virus, un virus, una proteína recombinante, una inmunoglobulina, o una vacuna de base viral.

Además, según dichos primer y segundo aspectos, cuando el producto biológico recombinante es un vector viral, preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, retrovirus, virus del herpes simple, virus de la vacuna, virus del sarampión, baculovirus y poxvirus. Se prefieren particularmente adenovirus, lentivirus o AAV. Los métodos adecuados para introducir los diferentes tipos de vectores virales en células productoras serán evidentes para el experto, e incluyen, por ejemplo, transfectar células productoras con plásmido o plásmidos para la producción de vectores lentivirales o AAV. Más preferiblemente, el vector viral recombinante es un vector de adenovirus (ya sea competente o deficiente en la replicación). Sin embargo, se prefiere especialmente la producción de vectores de adenovirus de serotipo 5 con replicación deficiente, AAV o lentivirus.

Además, según dichos primer y segundo aspectos, cuando el producto biológico recombinante es un vector viral, el vector comprenderá un transgén terapéutico, preferiblemente un transgén terapéutico o cualquier elemento genético terapéutico, tal como ARNip, miARN, ARNhc. Por ejemplo, el transgén puede codificar, por ejemplo, un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tal como, por ejemplo, VEGF-D3 de forma corta; un inhibidor del crecimiento vascular (por ejemplo, endostatina, angiostatina); timidina cinasa (u otro polipéptido con actividad enzimática similar); un interferón (por ejemplo, interferón alfa-2b humano) u otro polipéptido con actividad inmunomoduladora similar; una proteína de transporte del casete de unión a ATP (ABC), tal como el miembro 4 de ABC1 (también conocido como ABCA4) o una proteína ALD, por ejemplo, la proteína ABCD-1; miosina VIIA; ciclooxigenasa-2; un receptor de PGF2-alfa; dopamina; la proteína beta de la subunidad de hemoglobina humana; o una subunidad o subunidades de anticuerpo monoclonal. Preferimos que el transgén tenga alrededor de ≥ 95 % de identidad con la secuencia de ADNc del polipéptido natural.

Además, según dichos primer y segundo aspectos, se prefiere especialmente la combinación del vector de adenovirus de serotipo 5 con replicación deficiente con un transgén de interferón alfa-2b humano. Dicho vector se puede construir con el gen humano en un casete de expresión que reemplaza las regiones E1a, E1b y pIX en el extremo 5' del genoma del adenovirus, como se conoce en la técnica. Dicha construcción de vectores se puede llevar a cabo por un experto, usando técnicas estándar de manipulación de ADN.

Alternativamente, el vector puede ser un vector lentivírico, por ejemplo un vector lentivírico que porta un transgén que codifica, por ejemplo, un VEGF, endostatina, angiostatina, timidina cinasa ABCA4, ABCD-1, miosina VIIA, ciclooxigenasa-2, receptor de PGF2-alfa, dopamina, la proteína beta de la subunidad de hemoglobina humana, o una subunidad o subunidades de anticuerpo monoclonal.

Además, según dichos primer y segundo aspectos, se prefiere especialmente que el vector descrito en el párrafo anterior se produzca mediante el método de la invención, en el que se inoculan células HEK293 o 293T (expandidas en suspensión, sin ningún medio en particular) en un biorreactor iCELLis® nano de 4 m² usando un medio que comprende preferiblemente entre 2×10^8 y 8×10^8 células, por ejemplo $5,2 \times 10^8$ células, o iCELLis® 500 100m² entre 5×10^9 y 2×10^{10} , por ejemplo 1×10^{10} células, cuando la densidad de siembra puede variar de 5.000 a 20.000 células por cm². Las células sembradas se pueden expandir entonces opcionalmente en el biorreactor. Dichas células sembradas se infectan/transfectan o transducen entonces dentro del biorreactor. Se puede usar, por ejemplo, el vector viral anterior con una MOI superior a 200 partículas de virus/célula, preferiblemente cuando la densidad

celular es 170.000-230.000 células/cm². Alternativamente, se puede utilizar una MOI más baja; preferimos una MOI de no más de alrededor de 10 partículas de virus/célula. La producción de virus dentro del biorreactor se realiza durante al menos 24, preferiblemente al menos 48 horas, antes de la recolección del virus.

7. Recolección del producto

- 5 El producto recombinante se puede obtener a partir de células cultivadas de cualquier forma conveniente. Algunos productos se liberan en el medio de cultivo celular, por lo que la recolección del producto se realiza mediante la recolección del medio. El medio se puede recolectar mediante perfusión (recolección continua del producto). La recolección del medio también se puede realizar drenando el medio del biorreactor al final de la producción, o el medio se puede recolectar varias veces durante el ensayo y reemplazando medio nuevo en el biorreactor. Por ejemplo, el lentivirus se injerta en el medio de cultivo celular, y la recolección del medio después de la transfección se puede realizar durante unos días.

- 15 Algunos productos se producen dentro de la célula y no se liberan al medio, por lo que es necesaria la liberación del producto desde las células. Además, algunos virus son virus líticos, tales como los adenovirus, y su formación tiene lugar en el interior de las células. La lisis celular se puede llevar a cabo por cualquier medio convencional. Preferiblemente, la lisis se lleva a cabo mediante el uso de un detergente, por ejemplo Tween, preferiblemente Tween 20 o Triton-X, o la lisis se puede realizar como autólisis si, por ejemplo, se están produciendo virus líticos. Finalmente, muchos virus pueden lisar la célula, pero puede ser preferible recolectar el producto que todavía está dentro de las células. El método tradicional consiste en recolectar las células y liberar el producto mediante congelación y descongelación. Las células se pueden recolectar de los matraces o del biorreactor mediante disociación celular, en la que las células adherentes se eliminan de la superficie del cultivo mediante productos químicos. Para la eliminación de células, se puede usar tripsina o EDTA o cualquier derivado o cualquier reactivo apropiado. La lisis alternativa se puede llevar a cabo mediante una disolución hipotónica, tal como por ejemplo usando agua.

- 25 Además, las células se pueden lisar dentro del biorreactor. La lisis química que usa, por ejemplo, Triton-X o Tween rompe la membrana celular y libera el producto en el medio/amortiguador. El producto se puede recolectar recogiendo el material lisado. También se puede usar la autólisis como una opción de liberación, en la que la producción de virus se prolonga y las células se lisan de forma natural como consecuencia de la infección. Normalmente, la autólisis tarda unos días más que si se recolecta el producto a partir de las células. La purificación del producto recombinante liberado se puede llevar a cabo usando métodos de purificación convencionales.

- 30 La lisis de las células libera el producto en el sobrenadante, pero también libera contaminantes, tales como proteínas intracelulares o ácidos nucleicos genómicos. Se ha demostrado que una alta concentración de partículas virales y/o una alta concentración de componentes contaminantes causan agregación viral, lo que puede conducir finalmente a un rendimiento total bajo, o incluso al rechazo del lote. Curiosamente, mostramos por primera vez la lisis celular eficiente dentro del biorreactor de lecho fijo usando un amortiguador de lisis que en este caso fue amortiguador de lisis basado en Tween20. Notamos que el material recolectado era notablemente más transparente en comparación con la lisis de las células en suspensión o de las células recolectadas como células intactas y lisadas mediante congelación y descongelación. El lecho fijo funcionó como un "prefiltro", manteniendo una gran cantidad de desechos celulares dentro del lecho portador cuando la recolección primaria era bastante transparente. Esta fue una mejora notable, porque el material de carga para la purificación era mucho más puro.

- 40 Se observó que no todo el producto se puede recolectar drenando vacío el biorreactor. El aclarado del biorreactor puede recuperar parte del producto aún adherido a los desechos celulares y a las fibras del soporte. El aclarado se puede realizar con medio de cultivo celular o cualquier otro amortiguador adecuado. El etapa de aclarado es una forma única de recuperar más partículas de virus (o cualquier otro producto biológico), y no es aplicable por ejemplo en biorreactores de suspensión en este contexto.

45 8. Digestión del ADN y prevención de la precipitación

- Las autoridades exigen la eliminación del ADN residual del producto clínico. Además, la presencia de contaminantes, tales como ácidos nucleicos celulares o proteínas virales, puede acelerar la agregación del producto. La agregación del virus o cualquier precipitación es un problema conocido durante el procesamiento del producto, y puede terminar en una pérdida notable del producto, o incluso en el rechazo del lote total. Pudimos digerir el ADN genómico y evitar la agregación/precipitación visible del adenovirus al digerir el ADN genómico celular usando endonucleasa ADNasa, en este caso denominada Benzonase cuando la digestión se realizó fuera del biorreactor, como parte del procesamiento posterior del producto. Por otro lado, si se añadió una pequeña cantidad de Benzonase antes de la lisis y se añadió más enzima al biorreactor después de la lisis, se evitó la agregación del virus cuando se añadió un alto contenido de sal después de la digestión con Benzonase al sobrenadante (Figura 5).

55 9. Conclusión

Los métodos de la invención producen células y líneas celulares de alto valor comercial. Por ejemplo, una célula adaptada a la suspensión capaz de crecer en condiciones de cultivo adherentes será útil en la producción de productos recombinantes. Las células se pueden obtener mediante los métodos descritos aquí; sin embargo, métodos alternativos pueden resultar evidentes para el experto. La invención aquí descrita revela, por primera vez, que se puede hacer que las células adaptadas a la suspensión vuelvan a tener un carácter adherente. Ahora que esto se ha apreciado, el experto reconocerá que puede haber muchas maneras de lograr una nueva adherencia. En consecuencia, las células producidas mediante los métodos de la invención no se limitan al método de producción particular, sino que deben compartir las mismas características que las células descritas aquí; es decir, deben ser células adherentes adaptadas para crecer en condiciones de cultivo en suspensión y posteriormente acondicionadas para una nueva adherencia.

Ahora describimos nuestra invención mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

1. Línea celular productora

En estos experimentos se usaron como ejemplos de casos dos líneas celulares usadas habitualmente, las células HEK293 y 293T. Se cultivaron líneas celulares HEK293 o 293T adherentes a 37 °C y 5 % de CO₂ en matraces de cultivo celular usando medio Eagle modificado de Dulbecco (Sigma-Aldrich) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS, Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Invitrogen). Opcionalmente, se pueden añadir 50 µg/ml/50 UI/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). En suspensión, las células HEK293 o 293T se cultivaron usando medio exento de suero EXCELL 293 (Sigma-Aldrich) que contenía L-glutamina 6 mM y penicilina/estreptomicina 50 µg/ml. También se han usado otros medios, tales como CD293 (Invitrogen), BHK (Merck Millipore), Ex-Cell GTM3 (Sigma-Aldrich), Freestyle (Invitrogen) y SFM293 (HyClone) para el crecimiento de estas células en suspensión. En el biorreactor, las células adherentes se cultivaron usando DMEM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM. De hecho, usamos 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina para este experimento, pero preferimos evitar su uso en la fabricación a escala comercial real, si es posible.

2. Tipo de biorreactor adherente

En estos ejemplos, se usó un biorreactor iCELLis[®] Nano (Pall Life Science) con unidades de control Advance o MyControl (Applicon Biotechnology) y software BioXpert. Se probaron los biorreactores iCELLis[®] Nano de 0,8 m² (altura del lecho 2 cm, compactación del soporte 144 g/l), 2,67 m² (altura del lecho 10 cm, compactación del soporte 96 g/l) y 4 m² (altura del lecho 10 cm, compactación del soporte 144 g/l). Las sondas calibradas instaladas en el biorreactor se esterilizaron en autoclave durante 45 min 121 °C. Las células se inocularon usando una densidad entre 6.000 y 13.000 células/cm², y se usaron dos estrategias de alimentación, ya sea en modo discontinuo mediante medio de recirculación o perfusión. El punto de ajuste del pH fue 7,2, y se controló mediante CO₂ en el espacio de cabeza o bicarbonato de sodio al 7,5 % (Life Technologies). El punto de ajuste del oxígeno disuelto (OD) fue 50 %, controlado mediante agitación y flujo de aire o de O₂ en el espacio de cabeza. Se monitorizaron diariamente la densidad celular, el pH y la glucosa/lactato. La glucosa y el lactato se analizaron mediante un reflectómetro (MerckMillipore), y el pH se midió fuera de línea con SevenGo Pro SG8 (Mettler Toledo). Se tomaron tiras de fibra de soporte de la parte superior del biorreactor usando pinzas estériles, se agitaron en 1 ml de disolución de lisis A (Fisher Scientific) durante 5-10 min, y los núcleos se contaron mediante hemocitometría e inspección microscópica. La biomasa se monitorizó usando un monitor ABER Biomass (Applicon Biotechnology) y el software FuturaLite.

Se analizaron diariamente la densidad celular, el pH, la glucosa y el lactato del iCELLis Nano. Los soportes se sacaron del biorreactor usando pinzas estériles. Se agitaron tres soportes en 1 ml de disolución de lisis A durante 5-10 min, y los núcleos se contaron usando un hemocitómetro y un microscopio. Un soporte se sumergió en 1 ml de cristal violeta y se aclaró con 3x1 ml de PBS. Las células adheridas se observaron al microscopio. Un soporte se sumergió en 1 ml de azul tripán y se aclaró con 3 x 1 ml de PBS. Se observaron células muertas al microscopio. Se tomaron alrededor de 5-8 ml de medio del biorreactor para medir el pH, y también se analizaron la glucosa y el lactato de una muestra diluida 1:100 en PBS.

Además, se usó el sistema de control iCELLis[®] 500 (Pall Life Science) junto con el software Futura Scada para ensayos de biorreactores a gran escala. El biorreactor iCELLis[®] 500 estaba provisto de un casete que albergaba el lecho de fibra de PET con un área superficial de 500 m² (altura del lecho 10 cm, compactación del soporte 144 g/l) o 100 m² (altura del lecho 2 cm, compactación del soporte 144 g/l) para el crecimiento celular. Se usó un biorreactor de 500 m² para estudiar la distribución de células en un biorreactor. En el primer experimento de producción de virus se usó un biorreactor de 100 m². Los parámetros de cultivo fueron los mismos que en los experimentos de iCELLis[®] Nano. Se tomaron muestras del medio diariamente, y la glucosa, el lactato y el pH se midieron fuera de línea. Se usaron BioWelder y BioSealer (Sartorius Stedim Biotech SA) para formar conexiones y sellamientos de tubos estériles durante la producción. El volumen de trabajo total en el iCELLis[®] 500 de 100 m² fue 65 l. En el momento de la recolección, los soportes se trataron in situ con amortiguador de lisis al 1 % en medio de crecimiento durante 2 h a

37 °C, agitando continuamente el medio en el lecho fijo del biorreactor. El medio que contenía virus se drenó, y los soportes se aclararon con un volumen de trabajo para recuperar más virus del lecho fijo.

3. Métodos de expansión en suspensión

5 Hay diferentes tipos de métodos de expansión en suspensión disponibles. En suspensión, cultivamos células HEK293 o 293T ya sea en frascos giratorios (Corning Incorporated Life Sciences), matraces agitadores (Corning Incorporated Life Sciences), matraces giratorios (Corning Incorporated Life Science), en un sistema de perfusión BIOSTAT® CultiBag RM (Sartorius Stedim Biotech S.A.) o en Wave Bioreactor (GE Healthcare) en una densidad de siembra de $0,5 \times 10^6$ células/ml (dos veces por semana). En estos ejemplos se usó el medio Ex-Cell de Sigma-Aldrich Co. LLC. Está desarrollado para favorecer el crecimiento de células en suspensión, y carece, por ejemplo, de calcio y otros componentes para la adhesión celular. No se observó adhesión de células HEK293 ni 293T en la botella. Las células se pasaron en suspensión hasta que se usaron para inocular el biorreactor iCELLis® nano.

10 El primer experimento para estudiar la expansión en suspensión y la adhesión de las células al biorreactor se llevó a cabo sin producción de virus (véanse también los estudios de inoculación 4. Inoculación). Se inoculó un biorreactor iCELLis® Nano de 10 cm de altura de lecho (4 m^2) con células HEK293 en suspensión expandidas en frascos giratorios usando una densidad de siembra de $13.000 \text{ células/cm}^2$, y las células se cultivaron durante cinco días. Se tomaron muestras diariamente de los soportes de la parte superior del biorreactor, y se realizó un recuento de núcleos (figura 2a). Al final del experimento, el biorreactor se abrió, y se tomaron muestras de los soportes del fondo, mitad y parte superior del lecho de fibras fijo. La densidad celular promedio fue $172.600 \text{ células/cm}^2$, pero había muchas más células en los soportes del fondo que en los de la parte superior. Por lo tanto, se concluyó que las células crecieron bien en adherencia pero se distribuyeron de manera desigual dentro del lecho fijo (Tabla 1). Este fenómeno explica por qué no pudimos contar un número equivalente de células de los soportes de la parte superior a las que se inocularon en el biorreactor.

15 El primer experimento ejecución a gran escala de iCELLis® 500 se centró únicamente en la expansión en suspensión en una prueba a gran escala y de crecimiento celular adherente, pero esta vez usando una densidad de siembra más baja de $6.000 \text{ células/cm}^2$, para explorar la posibilidad de un "sobrecrecimiento" de las células en los soportes del fondo. Las células se atraparon y se adhirieron al lecho de fibras fijo, y después se les hizo crecer la adherencia durante cinco días. El biorreactor se drenó y se abrió para permitir que se tomaran muestras de los soportes de fibra de las capas del fondo, media y superior. Debido al mayor diámetro del lecho fijo de este biorreactor, se tomaron muestras de soportes de cinco ubicaciones radiales diferentes dentro de cada capa, para investigar la variabilidad y la estratificación. Los resultados mostraron que no había una distribución homogénea de las células en iCELLis® 500, pero las diferencias no fueron tan drásticas (Tabla 1). La densidad promedio fue $103.600 \text{ células/cm}^2$. Las células se distribuyeron mejor en el iCELLis® 500 de mayor escala, lo que permitió aumentar la densidad celular durante la inoculación.

20 Calculando el tiempo de duplicación de las células, se puede estimar y comparar el crecimiento celular entre sistemas de diferentes tamaños. El tiempo de duplicación se calculó usando la fórmula: $N_t = N_0 2^{t/d}$, en la que: N_t = número de células en el momento t, N_0 = número de células inicial, t = tiempo, d = tiempo de duplicación. El tiempo de duplicación para las células HEK293 en nuestros experimentos anteriores en matraces fue 28,8 horas (datos no mostrados). En el iCELLis® Nano, el tiempo de duplicación fue 29,6 horas, y en el iCELLis® 500 fue 29,0 horas. La indicación de crecimiento celular parece ser comparable entre el sistema de matraces e iCELLis®. Esto demuestra la practicidad de la tecnología iCELLis® para el crecimiento celular.

25 Tabla 1. Distribución celular (células/cm²) basada en el recuento de núcleos en iCELLis® Nano e iCELLis® 500 después de cinco días de cultivo. Se cargaron $13.000 \text{ células/cm}^2$ en iCELLis® Nano y $6.000 \text{ células/cm}^2$ en iCELLis® 500

ID del experimento	Fondo	Mitad	Parte superior
iCELLis® Nano (4 m^2)	325.200	112.000	60.600
Promedio	172.600		
iCELLis® 500 (500 m^2)	136.800	85.900	88.200
Promedio	103.600		

30 Las células en suspensión también se dividieron en matraces de cultivo celular normales de 175 cm^2 , a $4,5 \times 10^6$ células por matraz. Dos horas después de la inoculación, se observó bajo el microscopio la unión de las células al fondo de los matraces de células. El día 5, la confluencia celular fue alrededor de 70 %, y había en total $30,3 \times 10^6$

células en un matraz. Esto demostró que las células HEK293 adaptadas a la suspensión, expandidas mediante un procedimiento de suspensión, también podían unirse al fondo del matraz de cultivo celular y crecer allí.

4. Inoculación

5 Se estudió en detalle la inoculación del biorreactor iCELLis™ nano después de la expansión de las células en matraces giratorios o en frascos giratorios. Durante el primer experimento, después del recuento celular, se centrifugaron $5,2 \times 10^8$ células en suspensión (equivalente a $1,3 \times 10^4$ células/cm²) (209 g, 5 min, 20 °C), y se resuspendieron en 200 ml de medio de crecimiento DMEM+ FBS. El crecimiento celular se monitorizó contando las células (núcleos) de los soportes de la parte superior (Figura 2a).

10 Estudiamos la posibilidad de omitir el etapa de centrifugación y de inocular células directamente desde la suspensión (en medio de suspensión) al biorreactor que contiene medio de cultivo celular adherente. Primero, se realizó un experimento en matraces. Células HEK293 adaptadas a la suspensión se cultivaron en matraces adherentes usando diferentes relaciones de DMEM y medio ExCell (100, 95, 90, 85, 80, 70 o 60 % de DMEM, siendo el resto ExCell). En el segundo experimento, las células también se infectaron para observar el efecto de los residuos de ExCell en la productividad. Una concentración baja de ExCell no tuvo un efecto tan importante sobre el crecimiento celular como la adherencia. Cuando la concentración de ExCell aumentaba, las células comenzaron a verse más redondeadas y no estaban adheridas muy firmemente al fondo del matraz. También se observó que el 5 % de ExCell residual en DMEM tiene sólo un efecto menor sobre la productividad; la disminución fue del 7 % (datos no mostrados). Un 10 % de ExCell ya reduce el rendimiento total en un 19 %, y un 15 % de FBS disminuye un 63 %, respectivamente. En el experimento con matraces, no se pudo realizar ni probar la perfusión como se hará en el biorreactor.

20 Probamos la inoculación de células en suspensión en 100-200 ml de medio ExCell en el biorreactor iCELLis Nano que contiene 600 ml de medio de crecimiento adherente preequilibrado, con o sin FBS. Si FBS no estaba presente durante la inoculación, se añadió 10 min -2 h después de la inoculación. La velocidad de agitación se ajustó a 1050 rpm (2 cm/s) durante las primeras 2 h, y después se redujo a 755 rpm (1 cm/s). Después de la reducción de la velocidad, se siguió la adherencia de las células tomando una pequeña muestra de medio y contando las células. El número de células adheridas se determinó a partir de los soportes contando los núcleos. Según este experimento, las células se adherieron a soportes incluso si se habían adaptado anteriormente a crecer en suspensión. También estábamos buscando si FBS tenía algún efecto en la distribución celular, pero según el número de células en los soportes de la parte superior, se concluyó que la presencia de FBS durante la inoculación no tuvo ningún efecto en la distribución celular ni en la adhesión de las células a los soportes (figura 2a).

30 No sólo se expandieron en suspensión células HEK293 sino también 293T usando matraces giratorios y medio EXCell, y se inocularon 7.000 células/cm² en el biorreactor iCELLis Nano 4m². Las células 293T se adherieron a los soportes, y el crecimiento se monitorizó desde los soportes de la parte superior y también siguiendo el consumo de glucosa y la acumulación de lactato (figura 2b). Las células 293T crecieron bien en el biorreactor iCELLis como adherencia después de la expansión en suspensión.

35 Como conclusión, se probaron dos líneas celulares diferentes para determinar la expansión en suspensión antes de la fabricación adherente. Se observó que el método de inoculación es práctico, directamente desde el biorreactor de suspensión desechable a un biorreactor iCELLis sin ningún etapa adicional del procedimiento. Esto es una gran ventaja, y hace que esta innovación sea muy rentable y práctica. Todos los experimentos del biorreactor iCELLis a gran escala se inocularon directamente desde el biorreactor Cultibag (ver también 3. expansión en suspensión)

40 6. Condiciones de infección/transfección/transducción

Después de hacer crecer las células HEK293 expandidas en suspensión en modo adherente durante cuatro a cinco días, las células se infectaron (transdujeron) mediante el vector viral de adenovirus serotipo 5 (Ad5). En nuestro experimento, el MOI varió entre 50 y 400. Al biorreactor iCELLis Nano se pipeteó el volumen requerido de Ad5 en 800 ml de medio de crecimiento precalentado, y las células se infectaron mediante un intercambio completo de medio, o se añadió virus en un pequeño volumen directamente al biorreactor sin eliminar el medio. Después de la infección, el medio que contenía el virus se reemplazó por medio nuevo. Además, no se eliminó el medio viral, sino que se inició la perfusión para favorecer el crecimiento celular. Durante la perfusión, el virus restante se eliminó finalmente en los desechos.

50 El ejemplo de transfección se llevó a cabo mediante transfección mediada por fosfato cálcico para producir AAV. Se inocularon al biorreactor células 293T expandidas en suspensión, y la masa celular se expandió aún más en un biorreactor iCELLis durante cuatro días. La curva de crecimiento celular se muestra en la figura 2b. Las células se transfectaron con dos plásmidos y el método del fosfato cálcico. El método de transfección de plásmidos de células expandidas en suspensión se monitorizó 24 h después de la transfección mediante un microscopio fluorescente. La transfección había sido eficiente (figura 3).

55 Los biorreactores adherentes comerciales normalmente están provistos de un control automático del pH para mantener el medio de cultivo a un pH constante, añadiendo automáticamente una disolución básica (por ejemplo,

una disolución de bicarbonato de sodio) si el pH del medio de cultivo cae. Descubrimos que si el control automático del pH en el biorreactor iCELLis™ se deja operativo, entonces el biorreactor añadirá una disolución de base al biorreactor, lo que provocará la formación de un precipitado en el biorreactor. Ese precipitado, que creemos que es un precipitado de sal de ADN, no es deseable debido a que obstruye el biorreactor e impide la productividad. Descubrimos que al desactivar el control automático del pH después de la transfección y permitir que el pH del medio de cultivo caiga de forma natural, el medio de cultivo ligeramente ácido resultante evita la formación de precipitados, y por tanto aumenta el rendimiento.

7. El Producto y la productividad

En estos experimentos de prueba de concepto, se usó como ejemplo adenovirus tipo 5 que expresa interferón α 2b humano (Dinney et al. 2013). Los ejemplos de concepto no se limitan únicamente a este producto. La transfección de plásmidos se demostró usando el serotipo 2 del virus adenoasociado que expresa la proteína fluorescente verde como gen marcador.

Para estudiar la producción de virus después de la expansión en suspensión, se operaron tres iCELLis® Nanos para mostrar la prueba de concepto de la etapa de expansión en suspensión antes de la inoculación. Las células HEK293 se cultivaron en condiciones de suspensión sin suero de dos maneras, primero en frascos giratorios, y alternativamente, en un sistema de perfusión BIOSTAT® Cultibag RM. Para Cultibag, en primer lugar, las células adaptadas a la suspensión (500×10^6 células en 200 ml) de los frascos giratorios se transfirieron al sistema de perfusión Cultibag RM, en el que ya se habían equilibrado 800 ml de medio de crecimiento Ex-Cell que contenía L-glutamina 6 mM y penicilina/estreptomicina 50 μ g/ml. Por lo tanto, se logró una concentración celular inicial de $0,5 \times 10^6$ células/ml en un volumen de trabajo de 1 l. Las células se expandieron durante cuatro días hasta $2 - 4 \times 10^6$ células/ml en un volumen de trabajo de 1 l. La perfusión se inició cuando la densidad celular alcanzó $\geq 1,0 \times 10^6$ células/ml, y continuó durante toda la expansión. Durante la perfusión de Cultibag^{RM}, se introdujo medio de crecimiento reciente en Cultibag^{RM} al mismo ritmo que se eliminó el medio de desecho. La tasa de perfusión fue de un volumen de trabajo (1 l) cada 24 horas. Se cultivaron células 239T en condiciones sin suero en matraces giratorios. Las células de la expansión en suspensión se transfirieron al biorreactor iCELLis® Nano - las células HEK293 de los frascos giratorios al iCELLis® Nano de 0,8 m² (Experimento 1), y las del BIOSTAT® Cultibag^{RM} al iCELLis® Nano de 4 m² (Experimento 2). Las células 293T también se transfirieron al iCELLis Nano® de 4 m². La mayoría de las células quedaron inicialmente atrapadas en el lecho fijo en menos de 30 min, después de lo cual todas las células se adherieron a los soportes y continuaron creciendo en modo adherente. El crecimiento de las células HEK293 y 293T adherentes expandidas en suspensión se monitorizó calculando los núcleos (células) de los soportes de la parte superior cada día durante el cultivo. Ambas líneas celulares se adherieron a los soportes, y se observó un crecimiento exponencial (figura 2).

Se infectaron células HEK293 con adenovirus, y su productividad fue $5,6 \times 10^6$ (total de $4,4 \times 10^{13}$ pv) y $2,6 \times 10^6$ pv/cm² (total de $1,0 \times 10^{14}$ pv), respectivamente (Tabla 1). La titulación de Ad5 se realizó mediante el método de titulación de partículas virales basado en HPLC. El AAV se produjo en células 293T mediante transfección de plásmidos mediada por fosfato cálcico, y la productividad fue $1,1 \times 10^9$ GV/cm² (total de $4,5 \times 10^{13}$ GV, genoma viral analizado mediante el método de titulación basado en qPCR). La expansión en suspensión no tuvo un efecto importante sobre la productividad en comparación con la productividad si las células se expandieron en modo adherente.

El procedimiento se aumentó de escala, y por primera vez se probó iCELLis®500 100 m² para determinar el crecimiento celular después de la suspensión, seguida de la infección y producción de adenovirus. En este experimento, se sembraron células HEK293 en suspensión a una densidad de $0,5 \times 10^6$ /ml, y se expandieron a una densidad de $1,9 \times 10^6$ células/ml, usando un sistema de perfusión BIOSTAT® Cultibag RM. En el momento de la inoculación, se inocularon 1×10^{10} células directamente en el biorreactor iCELLis®500 100 m² que contenía medio de crecimiento equilibrado. Durante el experimento, se midieron diariamente fuera de línea la glucosa, el lactato y el pH. La perfusión se inició posteriormente, para favorecer el crecimiento celular con medio reciente. Las células se infectaron, y se continuó la perfusión para mantener la viabilidad y productividad celulares. El consumo de glucosa y la acumulación de lactato fueron comparables a los experimentos con Nano. El rendimiento de la cosecha fue $5,3 \times 10^{15}$ pv, y en un aclarado aún se encontraron $8,4 \times 10^{14}$ pv, que representan 14 % del rendimiento total. El rendimiento total de virus del biorreactor fue $6,1 \times 10^{15}$ pv, y la productividad $6,1 \times 10^9$ pv/cm² (Tabla 1, Experimento 3).

Tabla 2. Comparando la productividad de adenovirus en iCELLis Nano® después de diferentes métodos de expansión celular.

Sistema	Experimento n°	Explicación	Rendimiento (pv totales)	Área (cm ²)	Productividad (pv/cm ²)
Matraz		Matraces de control	$8,1 \times 10^{11}$	175	$4,6 \times 10^9$
iCELLis® Nano 0,8m ²	Experimento 1	Expansión en suspensión en frascos giratorios	$4,4 \times 10^{13}$	7.776*	$5,6 \times 10^9$
iCELLis® Nano 4 m ²	Experimento 2	Expansión en suspensión en BIOSTAT® CultiBag RM	$1,0 \times 10^{14}$	40.000	$2,6 \times 10^9$
iCELLis®500 100 m ²	Experimento 3	Aumento de escala del procedimiento. Expansión en suspensión en BIOSTAT® CultiBag RM	$6,1 \times 10^{15}$	1000.000	$6,1 \times 10^9$

5 Es notable que iCELLis®500 proporciona incluso más escalabilidad que la que se muestra en un ejemplo. La productividad se probó en un biorreactor de 100 m², mientras que el área máxima del biorreactor es 500 m², lo que teóricamente podría producir cinco veces más partículas virales, que en este caso es $2,65 \times 10^{16}$ pv. Como se explicó anteriormente, un producto en particular fue un productor bajo. Con este producto vimos que la productividad conseguida en matraces se mantenía igual incluso a gran escala.

10 Se pueden realizar cálculos interesantes usando uno de nuestros "altos productores" como ejemplo. Hemos visto que la productividad en matraces fue $2,23 \times 10^{10}$ pv/cm². Si este número se convierte a 100 m², se alcanzaría un rendimiento de cosecha total de $2,23 \times 10^{16}$ pv, y un rendimiento de cosecha de $1,12 \times 10^{17}$ en 500 m². En otras palabras, hemos podido desarrollar un método que puede cumplir con los requisitos de escala comercial y resolver el problema actual de aumento de escala del procedimiento de fabricación.

8. Recolección

15 Se probaron diferentes métodos de recolección. La recolección se puede realizar, por ejemplo, 48 horas p.i. antes de que el adenovirus lítico haya sido liberado de las células productoras al medio de cultivo celular. La muestra de medio, tomada a las 48 h p.i. para el análisis de HPLC, mostró que el número de partículas virales estaba por debajo del límite de detección, lo que demuestra que aún no se habían producido virus significativos y que los virus todavía estaban dentro de las células productoras. El biorreactor de lecho fijo iCELLis® resultó poco práctico para separar células mediante tripsina o derivados, ni tampoco para recolectarlas. Se decidió así ensayar la liberación del virus en el medio de cultivo celular mediante amortiguador de lisis química (Tween20). Para comprender la eficacia de la lisis/recolección in situ, se lisaron 22 soportes en un baño de agua durante 2 h a 37 °C, con 1 % de amortiguador de lisis en el medio de crecimiento, y agitación manual cada 10-15 min. El resto de los soportes de iCELLis® se probaron in situ dentro del biorreactor durante 2 h a 37 °C, con 1 % de amortiguador de lisis en el medio de crecimiento, y este se hizo circular continuamente a través del lecho de soporte fijo. El rendimiento de virus del biorreactor iCELLis® fue un total de $7,3 \times 10^{13}$ pv, y la productividad fue $9,9 \times 10^9$ pv/cm². La cantidad de partículas virales liberadas por los soportes cuando se lisaron en un baño de agua fue menor que cuando la lisis se realizó dentro del iCELLis®. Como control adicional, las células de los matraces de control también se tripsinizaron y recolectaron, seguido de la liberación del virus con el método tradicional de congelación y descongelación. Esto

20

25

30

35

mostró una productividad de $4,0 \times 10^9$ pv/cm². Estos resultados demostraron que la liberación del virus de las células lisadas dentro del lecho fijo de iCELLis® había sido eficiente. También se probó el mismo método de lisis para adenovirus de células HEK293, para liberar AAV de células 293T. La liberación de AAV fue eficiente, alcanzando un rendimiento total de $4,5 \times 10^{13}$ GV.

Para una mayor recuperación del virus, se probó la etapa de aclarado después de la lisis y la recolección, que es un método muy singular y no aplicable a muchos tipos de biorreactores. Cuando el biorreactor se aclaró con medio de cultivo celular normal, tal como DMEM, se recuperaron menos partículas de virus que cuando el biorreactor se aclaró con amortiguador que contenía detergente de lisis.

8.5 Recolección usando disolución hipotónica

40 Para aumentar el rendimiento, se pueden lisar células productoras y recolectar el producto de las células lisadas. Para lisar células, se puede usar una disolución hipotónica. Para probar esto, realizamos un experimento de lisis celular hipotónica en un biorreactor iCELLis™ nano. En este método, las células se expusieron a una disolución con una concentración de soluto mucho menor. La diferencia en la concentración de soluto crea un gradiente de presión osmótica. En un intento por equilibrar las concentraciones dentro y fuera de las células, el agua fluirá hacia el interior

de las células y puede hacer que se hinchen y exploten. En este experimento, las células infectadas se lisaron incubándolas en agua para irrigación.

5 Células HEK293 cultivadas en suspensión se inocularon en un biorreactor iCELLis nano de 4 m², y se expandieron durante aprox. 120 horas usando DMEM - 10 % - 1 % de L-Glutamina - 1 % de Pen-Step. Después de la expansión en el biorreactor, las células se infectaron con DVL WVSS 01 (rAd-IFN) preamplificado usando MOI 200. Aprox. 24 horas después de la infección, se comenzó a perfundir medio libre de suero. Aprox. 56 horas después de la infección, la recolección se inició transfiriendo el medio gastado desde el biorreactor a un recipiente separado. Se transfirieron 700 ml de agua para irrigación al biorreactor, y se agitó al 100 % durante 20 - 30 min sin calentamiento. El material de la cosecha se transfirió entonces a una bolsa separada. Para aclarar el lecho fijo, se transfirieron 600 ml de agua para irrigación al biorreactor, y se agitó al 100 % durante 5-10 min sin calentamiento. El material de aclarado se transfirió entonces a la bolsa, y se mezcló con el material de la cosecha. Se tomaron muestras de cada etapa, y la concentración de partículas adenovirales se analizó mediante AEX-HPLC (Tabla I).

Tabla I. Rendimiento de partículas virales del experimento de lisis de células hipotónicas.

Etapa de muestreo	Volumen (ml) (aprox.)	Concentración de virus (pv/ml) (AEX_15_032)	Rendimiento total de virus (pv)
Medio	900	no detectado	-
Recolección WFI (ponderada)	693	1,78E+10	1,23E+13
Aclarado WFI	600	2,59E+10	1,55E+13
Cosecha agrupada (ponderada)	1338	2,88E+10	3,85E+13

15 9. Digestión del ADN y prevención de la precipitación/agregación

Las autoridades exigen la eliminación del ADN del producto final. La eliminación del ADN se inicia digiriendo enzimáticamente el ADN. Cuando se probó el tratamiento con Benzonase™, la cosecha que contenía el virus se transfirió a vasijas separadas, y se trató con una concentración creciente de Benzonase™ (100-400u/ml). También se evaluó el efecto del tiempo de incubación (30-90 min.). Este experimento se realizó incubando el material cosechado a 37 °C. Cuando el tratamiento con Benzonase™ se realizó en recipientes separados, se logró una eliminación del 96 % del ADN genómico usando 400 U/ml y un tiempo de incubación de 90 min. Cuando el producto se procesó posteriormente, no se observó agregación o precipitación viral después de la recolección ni durante el procesamiento posterior. Estos resultados mostraron que la digestión en una sola etapa del ácido nucleico celular es eficiente cuando se realiza en un recipiente separado del interior del biorreactor. El producto se recogió del biorreactor cuando la mayoría de los desechos celulares aún permanecían en un lecho fijo (Figura 4).

Alternativamente, la digestión del ADN se probó dentro del biorreactor cuando se realizó el tratamiento con Benzonase™ antes y después de la lisis química de la célula productora, seguido de la adición de un amortiguador con alto contenido de sal. La formación de precipitación se estudió midiendo la turbidez (FNU) de la suspensión. Según nuestros hallazgos, la digestión del ADN, la adición de detergente de lisis (por ejemplo, Tween™ o Triton-X™) y un alto contenido de sal previenen la formación de precipitación. Se añadió una disolución salina de alta concentración para alcanzar NaCl 1000 mM. La muestra de recolección final contiene material que se trató con pre-Benzonase™, lisis basada en Tween-20, Benzonase™, y se diluyó en un amortiguador que contenía NaCl 1 M, Hepes 50 mM, Tween 20 al 1 % m/V, glicerol al 1 % cuando no se detectó aumento de la turbidez (Figura 5).

Modificación

35 No se usó ninguna modificación de las células ni técnicas de adaptación prolongadas, algo completamente contrario a lo esperado. Los cultivos de no adherencia proporcionados por el sistema FVT pudieron adherirse a los soportes de iCELLis nano.

Resultados y discusión

40 Este ejemplo demuestra la expansión de las células HEK 293 adaptadas a la suspensión no dependientes del anclaje en un biorreactor de suspensión (que puede ser, por ejemplo, el Cultibag de Sartorius o un biorreactor de ondas correspondiente, o incluso cualquier tipo de biorreactor de tanque agitado o sistema de matraces agitadores para células adaptadas a la suspensión), y su inoculación en un biorreactor iCELLis, para ser cultivadas en un sistema de adherencia.

45 Todos los informes publicados introducen un crecimiento adherente bidimensional usando, por ejemplo, frascos giratorios adherentes, fábricas de células o pilas de células como únicas opciones para la expansión de las células

adherentes. Gelbras et al. han estado estudiando el biorreactor iCELLis, su función, y el crecimiento celular dentro de él. Observan que cuando se inoculan células adherentes en el biorreactor, primero es necesario separar las células del fondo del matraz/frasco adherente (en el que se expanden), usando, por ejemplo, tripsina (o un análogo). Las células se suspenden en un medio de crecimiento celular y se inoculan en el biorreactor. Estas células siguen siendo típicamente células dependientes del anclaje. Como estudiaron Gelbras et al., formando primero la suspensión celular para la inoculación, afirman precisamente que el crecimiento y la muerte celular se suponen insignificantes sólo durante la fase de adherencia. El único consejo del especialista del fabricante fue estudiar la densidad celular mínima absoluta, y así minimizar el número de células necesarias para la inoculación. Todo esto indica que nadie ha considerado previamente el uso de ningún tipo de sistema de células en suspensión para expandir las células que se van a inocular en cualquier tamaño de biorreactor de tipo adherente, ya que las células adaptadas al procedimiento de suspensión se han modificado para que no se adhieran.

Dada nuestra descripción, el experto puede realizar fácilmente variaciones para lograr el beneficio de nuestra investigación en diferentes aplicaciones específicas. Por ejemplo, aunque ejemplificamos la lisis de células productoras que se han cultivado usando un cultivo celular adherente, el experto podría usar fácilmente la misma técnica para lisar células productoras que se han cultivado en modo de suspensión. Por lo tanto, pretendemos que la cobertura de nuestra patente no se defina por nuestros ejemplos discutidos anteriormente, sino por las reivindicaciones legales que se citan a continuación. En las reivindicaciones adjuntas, el singular ("un", "una") abarca el plural. Usamos el término "transfección" para abarcar ampliamente la introducción de secuencias de ácidos nucleicos expresables y extrañas en una célula hospedante; esto incluye, por ejemplo, transformación, transducción e infección con un vector viral. Las etapas del método se pueden llevar a cabo en cualquier orden, excepto cuando se indique expresamente en la reivindicación legal.

Referencias

Dinney, C. P., M. B. Fisher, N. Navai, M. A. O'Donnell, D. Cutler et al. 2013 Phase I trial of intravesical recombinant adenovirus mediated interferon-alpha2b formulated in Syn3 for Bacillus Calmette-Guerin failures in nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 190: 850-856.

Dormond, E., M. Perrier, y A. Kamen, 2009 From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? *Biotechnol.Adv.* 27: 133-144.

Iyer, P., J. M. Ostrove, y D. Vacante, 1999 Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production. *Cytotechnology* 30: 169-172.

Kamen, A., y O. Henry, 2004 Development and optimization of an adenovirus production process. *J.Gene Med.* 6 Supl. 1: S184-S192.

Lennaert A., Knowles S., Drugmand JC. y Castillo J. Viral vector production in the integrity® iCELLis® single-use fixed-bed bioreactor, from bench-scale to industrial scale. 7 (Supl. 6), 59-60. 2013. *BMC Proceedings*.

Ref Type: Generic

Meuwly, F., P. A. Ruffieux, A. Kadouri, y S. U. von, 2007 Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: bioprocess and biomedical applications. *Biotechnol.Adv.* 25: 45-56.

Salmon, F., K. Grosios, y H. Petry, 2014 Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera(R)). *Expert.Rev.Clin.Pharmacol.* 7: 53-65.

Segura, M. M., A. Garnier, Y. Durocher, H. Coelho, y A. Kamen, 2007 Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification. *Biotechnol.Bioeng.* 98: 789-799.

Stacey, G. N., y O. W. Merten, 2011 Host cells and cell banking. *Methods Mol.Biol.* 737: 45-88.

Vellinga, J., J. P. Smith, A. Lipiec, D. Majhen, A. Lemckert et al. 2014 Challenges in manufacturing adenoviral vectors for global vaccine product deployment. *Hum.Gene Ther.* 25: 318-327.

Wu, S. C., G. Y. Huang, y J. H. Liu, 2002 Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: a comparative study using microcarrier and stationary cell culture. *Biotechnol.Prog.* 18: 617-622.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un producto biológico recombinante, que comprende:
- (a) obtener células que se han expandido en modo de suspensión; y
- 5 (c) inocular las células en un biorreactor que tiene un soporte de fibras empaquetadas que proporciona un área superficial para el cultivo de células adherentes; y entonces
- (d) exponer las células a un factor que promueve la adherencia, seleccionado del grupo que consiste en: suero fetal bovino, colágeno, fibronectina, laminina, iones de calcio, proteoglicanos, y polisacáridos de la ECM, en una cantidad eficaz para promover la adherencia, mediante lo cual las células se adhieren a dicho soporte de fibras empaquetadas en dicho biorreactor.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, que comprende además:
- (b) antes de dicha etapa de inoculación, expandir las células en modo no adherente.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- (e) después de que las células se adhieran al soporte, introducir un transgén en las células.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que el transgén se introduce en las células después de dicha etapa de inoculación.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además:
- (f) recolectar el producto biológico recombinante.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que las células que se han expandido en modo de suspensión se seleccionan del grupo que consiste en HEK293, 293T, o cualquier línea celular relacionada con HEK293, células HT-1080, HepG2, A549, CHO, BHK, Sf9, Sf21, NCL, UR, N52.E6, BTI-Tn 5 B 1-4, COS, NIH/3T3, Vero, NSO, NC5TI 1, PerC6 o Her;
- 20 opcionalmente en el que las células que se han expandido en modo de suspensión se seleccionan de células HEK293 y 293T.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el producto biológico recombinante es un
- 25 (i) vector viral,
- (ii) partícula de tipo viral,
- (iii) virus,
- (iv) proteína recombinante,
- (v) inmunoglobulina, o
- 30 (vi) vacuna de base viral.
8. El método según la reivindicación 7(i), en el que el vector viral comprende un transgén terapéutico.
9. Uso de células adaptadas a la suspensión en un método para la producción de un producto biológico recombinante; en el que las células se han expandido en un cultivo celular en suspensión; y en el que el método comprende inocular las células expandidas obtenidas del cultivo en suspensión en un biorreactor que tiene un soporte de fibras empaquetadas, y después exponer las células a un factor que promueva la adherencia, seleccionado del grupo que consiste en: suero fetal bovino, colágeno, fibronectina, laminina, iones de calcio, proteoglicanos, y polisacáridos de la ECM, en una cantidad eficaz para promover la adherencia, mediante lo cual después de inocular las células, las células se adhieren al soporte de fibras empaquetadas en el biorreactor, y las células expandidas se cultivan en modo adherente para producir el producto biológico recombinante.
- 35

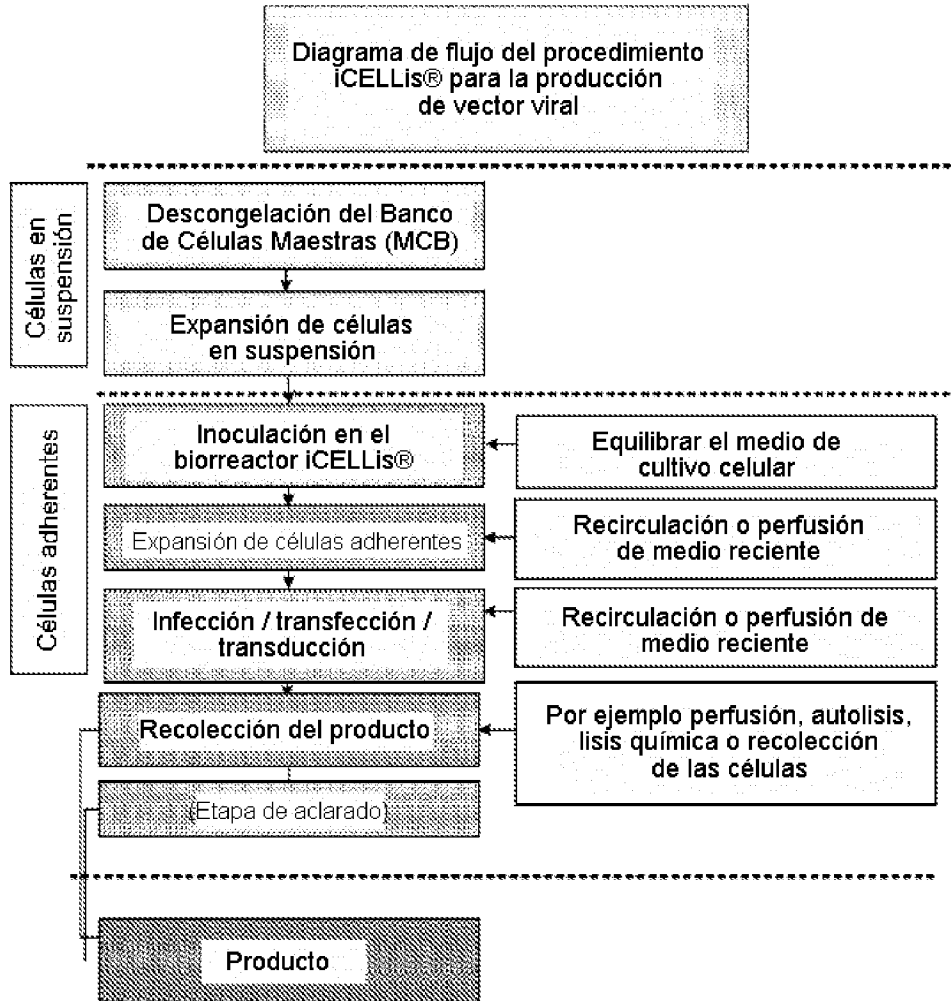


Figura 1

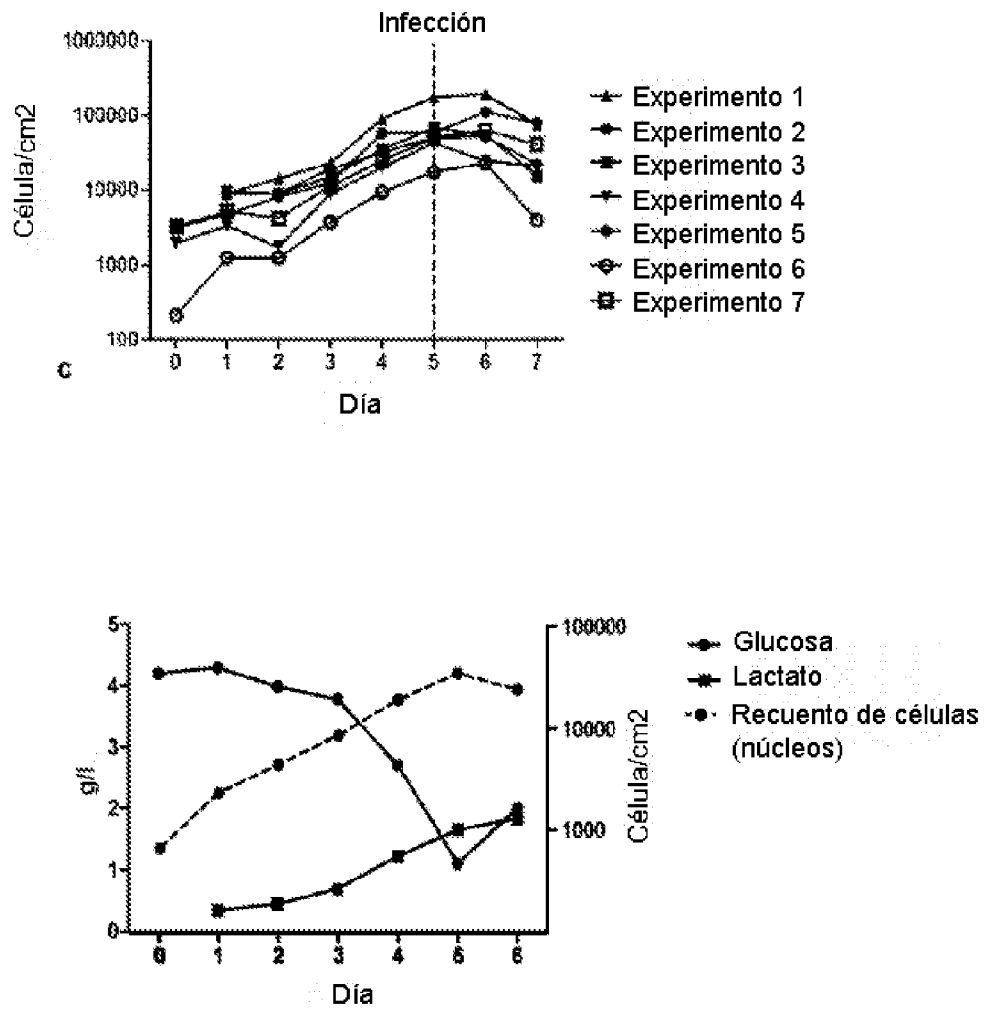


Figura 2

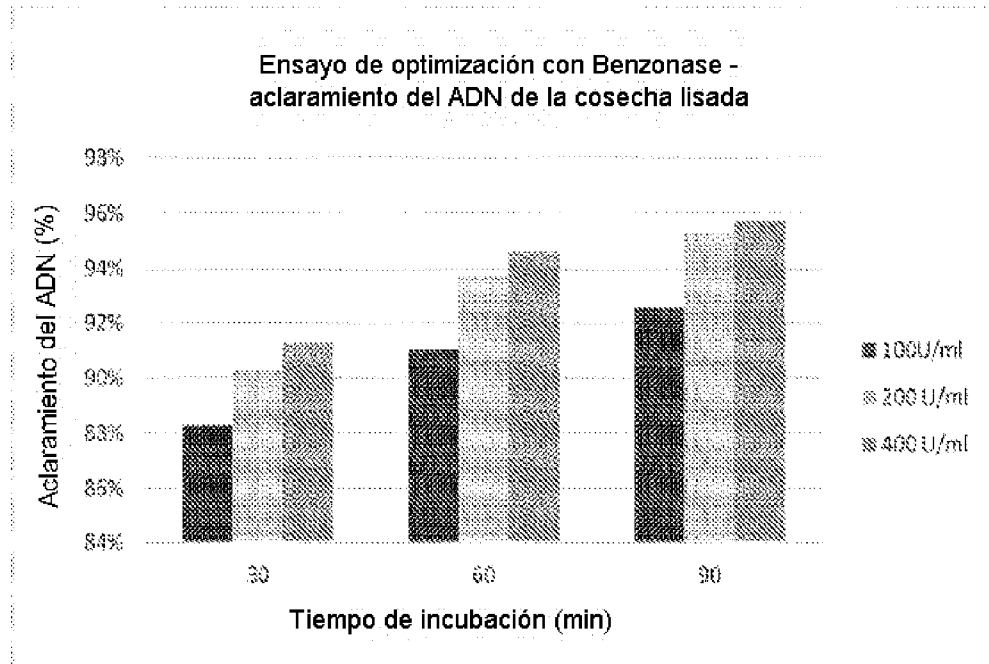


Figura 4

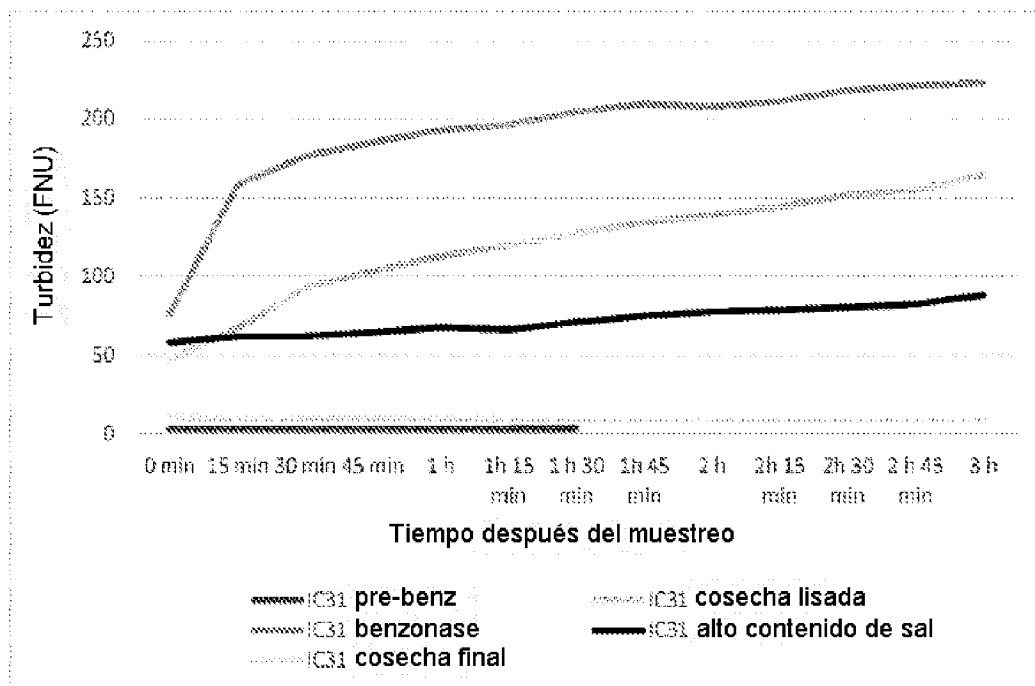


Figura 5



Figura 3