



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 631**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07103139 .7**
96 Fecha de presentación : **17.12.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1801201**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Reparación de células para la producción de material biológico.**

30 Prioridad: **24.12.1997 EP 97204110**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2011

73 Titular/es: **Abbott Biologicals B.V.**
C.J. Van Houtenlaan 36
1381 CP Weesp, NL

72 Inventor/es: **Brands, Rudi**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 631 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

Preparación de células para la producción de material biológico

El presente invento tiene que ver con un método para la preparación de células para usar en la producción de material biológico.

- 5 Para la producción de material biológico, por ejemplo líneas celulares, se necesitará la preparación de cantidades grandes de células usando un procedimiento de escalado en bioreactores.

El documento de patente norteamericana N° 5.017.490 describe tal procedimiento de escalado que proporciona en particular la ventaja de un bajo riesgo de contaminación por transferencia. Este método no es, sin embargo, adecuado para células dependientes de anclaje (de ahí que, no sea para células que sólo crecen si están fijadas a un sustrato) o células embebidas en un sustrato (por ejemplo vehículos porosos).

- 10 El documento de patente norteamericana N° 4.644.912 describe un método para la preparación de células dependientes de anclaje para la producción de material biológico (es decir, virus) comenzando con una semilla de células de trabajo, y con subsiguientes pases efectuados en volúmenes crecientes consecutivos de bioreactores de 1 litro, 5 litros, 25 litros, 150 litros, y finalmente bien en un bioreactor de 1000 litros o en reactores múltiples de 150 litros. Entre cualquiera de estas etapas de pases las células fueron liberadas de sus vehículos con una disolución de proteasa diluida. En el pase final la inoculación por virus fue efectuada.

La solicitud de patente internacional WO 97/37000 describe células animales que pueden ser infectadas por virus de la gripe y que se adaptan a crecer en suspensión en un medio sin suero, y a procedimientos para la replicación de virus de la gripe en cultivos celulares usando estas células.

- 20 Asumiendo tiempos de ciclo celular promedio de alrededor de 20 a 24 horas los intervalos de pases pueden ser de alrededor de 3-5 días. Por lo tanto, para expandir las células a cultivos lo suficientemente grandes a partir de un MWCS (MWCS =banco de células de trabajo del fabricante) el procedimiento total de escalado puede llevar varias semanas, dependiendo del volumen del bioreactor final.

- 25 En los métodos anteriores para la preparación de células cada uno de los lotes de producción finales tiene que ser preparado a partir de MWCS. Para la producción de grandes cantidades de material biológico será necesario utilizar varias líneas de cultivo en paralelo hasta los volúmenes del recipiente más grande. Tal procedimiento de preparación, por consiguiente, consume mucho tiempo y necesita la operación de un número muy considerable de bioreactores para la preparación de las células así como para la producción de material biológico.

- 30 Es un objeto del presente invento proporcionar una producción más rápida en la preparación de células para la producción de material biológico.

Por consiguiente, el presente invento se refiere a un método para la preparación de células para usar en la producción de material biológico, cultivando células hasta un volumen celular deseado de un lote de preproducción, en el que después en un proceso discontinuo repetitivo:

parte de las células del lote de preproducción es usada para la preparación de al menos un lote de preproducción, y

- 35 la parte restante de las células del lote de preproducción es usada como una semilla para la preparación de al menos un lote de preproducción subsiguiente, y las células de los lotes de producción se usan para la producción de material biológico, en donde un primer lote de preproducción se prepara a partir de patrón de semilla de trabajo mediante al menos una etapa de pases.

- 40 Más en particular, el presente invento se refiere a dicho método para la preparación de células para usar en la producción de material biológico, cultivando células hasta un volumen celular deseado de un lote de preproducción, en el que después en un proceso discontinuo repetitivo:

parte de las células del lote de preproducción es transferida para ser usada para la preparación de al menos un lote de preproducción, y

- 45 la parte restante de las células del lote de preproducción es transferida para ser usada como una semilla para la preparación de al menos un lote de preproducción subsiguiente.

Según el presente invento el primer lote de preproducción es preparado a partir de un patrón de semilla de trabajo mediante al menos una etapa de pases.

- 50 En una realización adicional preferida del presente invento las células que son preparadas son dependientes de anclaje. En el último caso generalmente será necesario que las células sean hechas crecer sobre un sustrato. Será entonces recomendable durante el proceso repetido cada vez cuando parte del lote es usado para la preparación de

un nuevo lote añadir una cantidad adicional de sustrato. En una realización preferida, cada tiempo previo a la adición de sustrato al menos parte de las células son primero liberadas de sus sustrato original.

Como se usa aquí la expresión "producción en lotes" significa un cultivo de células que es empleado para la producción de material biológico.

- 5 Como se usa aquí, la expresión "preproducción en lotes" significa un cultivo de células que es usado en el proceso según el presente invento para la preparación de al menos un lote de producción (como se define anteriormente) y un lote de preproducción en lote subsiguiente.

Como se usa aquí la expresión "material biológico" significa cualquier sustancia u organismo que puede ser producido a partir de un cultivo celular. Ejemplos de "material biológico" son virus y proteínas tales como enzimas.

- 10 Como se usa aquí la expresión "patrón de semillas de trabajo" significa una cantidad de cierto tipo de células de ancestros definidos almacenadas para ser usadas como una semilla a partir de la que todos los cultivos del mismo tipo de células son derivados.

Como se usa aquí la expresión "células dependientes de anclaje" significa células que para su propio crecimiento y/o propagación necesitan estar unidas a un sustrato como se define aquí.

- 15 Como se usa aquí la expresión "sustrato" significa cualquier materia particulada útil para la unión de células.

- Como se usa aquí la expresión "etapa de pases" significa una secuencia de actividades en la propagación y producción de células que comprenden al menos la transferencia de una cantidad adecuada de células y de una cantidad adecuada de medios de cultivo en un recipiente de producción, la incubación del recipiente en condiciones adecuadas para el crecimiento y propagación de las células durante un tiempo suficiente para el crecimiento eficaz y propagación de las células. Opcionalmente una etapa de pases puede comprender la separación de las células a partir del medio de cultivo y/o del sustrato después de un tiempo suficiente para el crecimiento eficaz y propagación de las células.
- 20

- Quedará claro para el profesional experto en la técnica que el método según el presente invento difiere esencialmente de los métodos conocidos en la técnica en los que las células son producidas en un proceso continuo más que en el proceso discontinuo presente. Según las publicaciones de patentes EP0417531 y WO89/08701 los sistemas de cultivo continuos pueden ser empleados también para la producción de virus. Primero las células son hechas crecer en un primer bioreactor, y después de que se ha alcanzado una cierta densidad celular son alimentadas de modo continuo desde dicho primer bioreactor a un segundo bioreactor. En este segundo bioreactor los virus son hechos crecer sobre células y subsiguientemente estos virus son retirados de modo continuo a partir de este segundo bioreactor.
- 25
- 30

El método básico de trabajo según el presente invento es usar un bioreactor madre desde el que el/los bioreactor/es de producción es/son alimentado/s con células. Cuando las células son dependientes de anclaje, después de cada etapa de pases las células necesitan preferiblemente ser liberadas de sus sustratos.

- Un procedimiento de tripsinización sobre grandes bioreactores ha sido desarrollado para este propósito. Las células de producción son definidas hasta un número de pases específico y característico para el así llamado ECB (ECB= Banco de células extendido). El método descrito permite una producción de alto rendimiento puesto que la ruta de escalado desde WCS hasta las células de producción puede ser acortado en gran medida y muchos menos bioreactores son necesarios puesto que las líneas de producción en paralelo ya no son necesarias.
- 35

Varias realizaciones del presente invento son descritas en la Figura 1.

- 40 En una realización preferida las células son expandidas de una ampolla de un MWCS hasta el nivel del primer lote de preproducción a través de una o más etapas de pases. El tamaño del bioreactor usado para tal lote de preproducción puede oscilar desde varios litros de volumen de trabajo hasta varios cientos de litros. A continuación, una parte, por ejemplo 10-20% de las células así expandidas (por ejemplo pase X) son usadas para repoblar un bioreactor para la producción de un lote de preproducción subsiguiente (siendo el pase número X + 1), mientras que el grueso de las células es transferido (pase X o X+1) a una tamaño de bioreactor mayor para comenzar la producción directamente o para primero repoblar, y subsiguientemente comenzar la producción.
- 45

En líneas de producción en serie clásicas el número de duplicaciones de las células derivadas del MWCS en el momento de la recogida es conocido de antemano con ciertos límites. Un número de generaciones máximo permitido es seleccionado en el sistema de producción al comienzo.

- 50 En el método según el presente invento el número máximo de pases celulares puede ser definido por el ECB. El número de pases de producción (el número de pases celulares usados previamente a la producción del producto biológico), es por tanto, irrelevante dentro de los límites establecidos por el ECB. Como consecuencia, tal número

máximo de pases ha de ser obedecido en vista de las restricciones reguladoras. Como resultado del particular lote de productos biológicos en el producto final de una ruta de escalado directo.

5 Para verificar si las especificaciones de las células en el estadio de ECB en la producción son similares al MCB (MCB = Banco de células principal) se necesita llevar a cabo una validación específica para este propósito con respecto a las características de crecimiento, libertad de agentes adventicios, externos o endógenos en las diferentes etapas, análisis cariológicos de isoenzimas y así sucesivamente. Una vez tal ECB es totalmente caracterizado se puede permitir producir el producto con células a cualquier número de pases entre MCB y ECB, puesto que se puede asumir que las células no han cambiado entretanto en sus especificaciones. Como resultado, los ensayos en los MWCS por lo tanto pueden limitarse a ensayos de esterilidad. Esto es una ventaja particular del método según el presente invento.

10 Con el número de pases máximo establecido se pueden usar células en cualquier estadio intermedio. A partir de aquí, para minimizar adicionalmente el tiempo necesario para expandir las células desde MWCS hasta el bioreactor de producción sería una ventaja permitir un comienzo de masa de células. Esto puede ser hecho por ejemplo en uno de los siguientes modos.

15 las células pueden ser dejadas en un cierto número de pases durante intervalos mayores a temperatura ambiente (17-32°C) y ser reactivadas hasta crecimiento en expansión log mediante el aumento de la temperatura y cambiando el medio de cultivo, o

20 las células pueden ser congeladas (Temp < -80°C) en masa y descongeladas previamente a transferirlas a un bioreactor de volumen preestablecido, reduciendo de este modo la necesidad de escalar hacia arriba la ruta de modo significativo.

El método según el presente invento puede ser llevado a cabo con cultivos de células animales y más en particular con células dependientes de anclaje. Tipos de células adecuados son por ejemplo células de hámster (CHO, BHK-1), células de mono (Vero), células bovinas (MDBK), células caninas (MDCK), células humanas (CaCo, A431) o células de pollo (CEF).

25 Como bioreactor según los inventos presentes puede ser usado una unidad única o una pluralidad de unidades de por ejemplo fermentadores agitados, fermentadores de lecho fijo, fermentadores de lecho fluido, fermentadores de aire, o reactores de fibra hueca.

30 Las células de los tiempos anteriores pueden y algunas deberían incluso ser cultivadas cuando se fijan a un soporte sólido, como microvehículos o macrovehículos en suspensión, por ejemplo en un lecho fijo, un lecho fluido o en suspensión, o como fibras huecas. Las células pueden también ser embebidas en un vehículo (por ejemplo vehículo poroso).

35 En el transcurso del método según el presente invento, en particular cuando se usa un soporte sólido, las células han de ser liberadas de su soporte sólido, Esto puede ser efectuado mediante cualquier método útil para liberar las células de un soporte sólido. Ventajosamente, para este fin se puede hacer uso de una disolución de enzimas proteolíticas. Opcionalmente, esta etapa de liberación enzimática puede ser precedida por una o más etapas de preacondicionamiento, por ejemplo, mediante tratamiento con PBS y/o EDTA, para potenciar la eficacia proteolítica, y/o para reducir la cantidad de enzima proteolítica requerida.

EJEMPLO 1

Liberación celular y separación de vehículos previamente a la transferencia al siguiente bioreactor.

40 Células dependientes de anclaje de la línea celular MDCK (MDCK = Madin Darby Canine Kidney (línea celular)) fueron cultivadas a 37°C en Cytodex-3 microvehículos (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (5 g de vehículo/l) en un bioreactor agitado de 4 litros ("bioreactor madre"). El medio de crecimiento fue EpiSerf (Life Technologies, Paisly, Escocia). El crecimiento fue continuado hasta un máximo de 5×10^6 células/ml de cultivo.

45 Las células fueron liberadas de los vehículos mediante tripsinización en una disolución tripsina-EDTA (Life Technologies, Paisly, Escocia).

Tras liberarse de los vehículos el 80% de las células liberadas fueron transferidas a otros 3 reactores de tamaño similar. Los bioreactores de "producción" últimos tienen todos los vehículos (sustratos celulares) añadidos a ellos de antemano. Se permitió que las células repoblaran los vehículos y usadas subsiguientemente para la producción en estos bioreactores de producción.

50 Se dejó que el resto de las células en el "bioreactor madre" repoblaran los vehículos Cytodex-3 restantes y fueron cultivadas hasta la densidad celular deseada.

EJEMPLO 2

Liberación celular sin separación de los vehículos previamente a la transferencia al siguiente bioreactor

5 El cultivo de células fue llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 1, sin embargo tras la tripsinización el 80% de las células liberadas incluyendo los vehículos son transferidas a los 3 bioreactores de producción. Adicionalmente, los vehículos adecuados fueron añadidos a todos los bioreactores.

EJEMPLO 3

Liberación celular sin separación de los vehículos tras la transferencia al siguiente bioreactor

10 El cultivo de células fue llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 1, sin embargo, el 80% de las células aún adheridas fueron transferidas a un bioreactor de tamaño similar que fueron a continuación usadas directamente para la generación del producto.

Las células restantes en microvehículos en el fermentador madre fueron a continuación liberadas mediante tripsinización, a las que después se añadieron nuevos vehículos y las células fueron dejadas que repoblaran los sustratos.

EJEMPLO 4

15 **Comienzo a partir de células en masa congeladas**

20 En este experimento parte del cultivo fue usado para reprocesar el fermentador madre y algunos fermentadores hijos y parte del cultivo fueron usada para congelar células en masa. Las células en masa congeladas (total $14,4 \times 10^8$ células) fueron inoculados en un cultivo de inicio en un fermentador madre de 3 litros que contenía 5 g de Cytodex por litro y medio de EpiSerf, y a continuación incubadas a 37°C. Los criopreservantes residuales fueron eliminados mediante un cambio de medio a día 1. A día 2 la tripsinización fue llevada a cabo, el 50% de las células fueron cultivadas en masa y el resto de las células fueron inoculadas sobre los microvehículos en un fermentador subsiguiente.

A partir de la Tabla 1 se puede deducir que las células continúan creciendo a una velocidad normal entre día 2 y día 3.

25 A día 4 el contenido del fermentador madre fue liberado con tripsina y reprocesado sobre nuevos microvehículos (10 g/l) en otros dos fermentadores junto con el fermentador madre.

A día 5 la eficacia de crecimiento en placa resultó ser de alrededor del 85%.

Tabla 1

| Día | Fermentador madre de 3 l | Fermentador de 3 l | Fermentador de 3 l |
|------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| | Células X 100.000/ml | Células X 100.000/ml | Células X 100.000/ml |
| 0 | NOD | | |
| 1 | 6,6 | | |
| 2 | 14 | | |
| 3 | 15,5 | | |
| 4 | 30 | | |
| 5 | 5,5 | 10 | 10 |
| Eficacia de puesta en placas | 85% | 85% | 85% |

EJEMPLO 5

Transferencia de un fermentador madre a pequeña escala a un fermentador de producción a gran escala

5 Las células fueron escaladas hasta una escala mayor en fermentadores de 65 litros y de 550 litros (50 litros y 250 litros de volumen de trabajo, respectivamente) usando un microvehículo de densidad de 5 g de Cytodex por litro. Como se puede observar a partir de la Tabla 2, el 90% del total de las células es transferido a un fermentador a gran escala desde un cultivo en fermentador de 50 litros con 800.000 células/ml de las cuales 69% demostraron ser viables.

Lo mismo se encontró en el fermentador madre de 50 litros, alrededor de 69% de las células repropagantes resultaron ser viables.

10 El procedimiento fue el siguiente:

A día 0, los vehículos se dejaron fijar en el cultivo de 50 litros, en el que después el sobrenadante (medio de cultivo) fue retirado y remplazado por PBS. El contenido del fermentador fue agitado durante 5-15 minutos. El sobrenadante fue eliminado después de liberarse de los vehículos. Esta etapa puede ser repetida si es necesario.

15 La siguiente etapa fue repetida con PBS/EDTA (0,4 gramos EDTA/litro PBS). De nuevo el cultivo fue agitado durante 5-15 minutos, los vehículos se dejaron asentar, el sobrenadante fue eliminado, y la etapa de PBS/EDTA fue repetida hasta que las células se hubieron vuelto redondas y estuvieron listas para ser liberadas con tripsina.

20 Luego la tripsina (0,025% de concentración final) fue añadida al PBS/EDTA e incubada durante 5-15 minutos. A continuación bien el sobrenadante que contenía las células (tras la eliminación de los ahora vehículos “desnudos”) fue transferido (como en el ejemplo 9) o bien la mezcla de las células mas los vehículos fue transferida (80% total de la mezcla total).

Tras la transferencia de las células a un fermentador de 550 litros el resto de las células (por tanto, el 10% de las células viables) se dejó que repoblaran los vehículos aún presentes en el fermentador tras rellenar el fermentador de 50 l con medio de cultivo.

Alrededor del 70% de las células demostraron ser viables

25 **Tabla 2**

| Día | Cultivo de 50 litros | Cultivo de 250 litros |
|-----|---|---|
| | Células X 100.000/ml | Células X 100.000/ml |
| 0 | 8 (400 x 10 ⁸ células totales) | 1,1 (275 x 10 ⁸ células viables) |
| 1 | | 0,8 |
| 2 | | 2,9 |
| 3 | | 3,4 |
| 4 | | 8,9 |
| 5 | | 18,0 |

EJEMPLO 6

Análogo al ejemplo 5, sin embargo, el 80% del cultivo de las células unidas al vehículo fueron transferidas desde el bioreactor madre al bioreactor de producción. La producción fue comenzada tras la adición del virus.

30 El 20% de las células y vehículos restantes en el bioreactor madre fueron tripsinizadas y liberadas y tras la adición de nuevo sustrato en el bioreactor madres se dejó que repoblaran el bioreactor madre mientras que la producción estaba en marcha en el bioreactor de producción separado físicamente.

EJEMPLO 7**Cultivo a gran escala comenzado a partir de células en masa congeladas.**

5 Las células en masa congeladas fueron descongeladas e inoculadas en un fermentador de 10 litros (volumen de trabajo) (densidad del vehículo Cytodex 5 g/l; medio de cultivo EpiSerf) a una densidad de inoculación de 1×10^6 células/ml. Tras la liberación, el medio de cultivo fue reemplazado para eliminar los crioprotectores residuales.

Tras el día 1 la cantidad de células viables unidas a los vehículos fue $0,45 \times 10^6$ células/ml que a partir de entonces comenzaron el crecimiento. A una densidad de $2,8 \times 10^6$ células/ml las células fueron liberadas de sus vehículos mediante tripsinización y el 80% fue transferido a un fermentador de volumen de trabajo de 50 litros (vehículos 5 g/l).

10 Como se puede deducir de la Tabla 3, a día 1 la cantidad de células tras congelación en masa de las células fue alrededor del 45%.

De la cantidad total de células transferidas, la viabilidad tras la liberación por tripsina fue de 71,4%.

Tabla 3

| Día | Densidad celular (x 10 ⁶ /l) in: | |
|-----|--|------------------------------------|
| | Fermentador de 10 litros | Fermentador de 50 litros |
| 0 | 1,0 | |
| 1/2 | 0,45 | |
| 3/4 | 1,3 | |
| 5 | 2,6 | |
| 6 | 2,8 (280 x 10 ⁸ total) | |
| 6 | 0,6 (60 x 10 ⁸ total) | 0,28 (140 x 10 ⁸ total) |
| 7 | | 0,4 (200 x 10 ⁸ total) |

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de material biológico, en el que las células se cultivan hasta un volumen de células deseado de un lote de reproducción, en el que después en un proceso discontinuo repetido:
- 5 a) parte de las células del lote de reproducción son usadas para la preparación de al menos un lote de producción, y
- b) la parte restante de las células del lote de reproducción es usada como una semilla para la preparación de al menos un lote de reproducción subsiguiente,
- y las células de los lotes de producción se usan para la producción de material biológico, en donde un primer lote de reproducción se prepara a partir de patrón de semilla de trabajo mediante al menos una etapa de pases.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que en el proceso discontinuo repetido:
- a) parte de las células del lote de reproducción es transferido para ser usado para la preparación de al menos un lote de reproducción, y
- b) la parte restante de las células del lote de reproducción es transferido para ser usado como una semilla para la preparación de al menos un lote de reproducción subsiguiente.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que las células son células dependientes de anclaje, las cuales para su crecimiento y/o propagación necesitan estar unidas a un sustrato.
4. El método según la reivindicación 2, en el que las células son células dependientes de anclaje que para su crecimiento y/o propagación necesitan estar unidas a un sustrato, las células se cultivan sobre dicho sustrato, y antes de cada etapa de transferencia las células se liberan de dicho sustrato.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las células son células MDCK.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el material biológico producido es un virus.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el virus que se ha de producir se añade al lote de producción para comenzar la producción de virus.
- 25 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el material biológico producido es una proteína.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el número de pases de cada lote de producción está entre el banco de células principal y el banco de células extendido.
- 30 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que las especificaciones de las células de cada lote de producción se validan para que sean similares a las del banco de células principal.

Figura 1

