

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 818**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2002 E 10011842 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2330189**

54 Título: **Método para la producción a gran escala de virus**

30 Prioridad:

10.12.2001 US 6881

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

29.08.2014

73 Titular/es:

**BAXTER HEALTHCARE S.A. (100.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH**

72 Inventor/es:

**REITER, MANFRED y
MUNDT, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 488 818 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

Método para la producción a gran escala de virus.

La presente invención se refiere a un método mejorado para la producción de virus o antígenos virales en un cultivo de células adherentes unidas a un microportador.

5 La producción eficaz de vacunas requiere el desarrollo de cantidades a gran escala de virus producidos en grandes cantidades a partir de un sistema huésped. Las condiciones de cultivo en las que se desarrolla una cepa viral son muy importantes en lo que se refiere a conseguir una producción aceptablemente alta de la cepa. Así, con el fin de maximizar la producción del virus deseado, tanto el sistema como las condiciones de cultivo se deben adaptar específicamente con el fin de proporcionar un entorno que sea ventajoso para la producción del virus deseado. Por
10 tanto, para lograr una producción aceptablemente elevada de las diversas cepas virales, es necesario un sistema que proporcione condiciones óptimas de crecimiento para una gran cantidad de virus diferentes.

El único proceso que es económicamente viable es un proceso en reactor, ya que la ampliación a escala se puede adecuar al tamaño del mercado y a las dosis de vacunas necesarias. En cuanto a las células adherentes, el proceso para preparar el soporte con un microportador clásico es actualmente la mejor elección para cultivos a gran escala
15 de aquellas células necesarias para la propagación viral (Van Wezel y col., 1967. *Nature* 216:64-65; Van Wezel y col., 1978. *Process Biochem.* 3:6-8). Se ha descrito la producción mediante procesos a gran escala del virus de la poliomielitis, virus de la Hepatitis A, VHS o virus de la enfermedad de Mareck en un microportador (US 4.525.349; Widell y col., 1984. *J. Virological Meth.* 8:63-71; Fiorentine y col., 1985. *Develop. Biol. Standard* 60:421-430; Griffiths y col., 1982. *Develop. Biol. Standard.* 50:103-110). Los procesos actuales basados en el cultivo en microportadores
20 permiten la producción de virus mediante fermentadores de un tamaño que alcanza los 1.200 l.

Caij y col. (1989, *Arch. Virol.* 105: 113-118) compararon las producciones del virus titulado del Cólera Porcino en cultivos en microportadores con los cultivos convencionales monocapa y descubrieron que, mediante la utilización del sistema microportador, se podía obtener una producción más elevada de virus por volumen de medio de cultivo.

Griffiths y col. (1982, *Develop. Biol. Standard.* 50:103-110) estudiaron la influencia de la concentración de microportadores sobre el crecimiento celular y la producción de VSH. Se descubrió que era necesaria una
25 concentración óptima de microportadores para alcanzar una alta densidad celular, lo que influía también en la producción viral obtenida. Sin embargo, concentraciones más altas de microportador en un sistema de perfusión resultaron en una pérdida celular debido a que la capa celular se desprendía de las perlas.

La productividad del proceso de producción viral en el sistema microportador depende del virus, de las células, del tipo de microportador y de la densidad celular obtenida en el sistema. Concentraciones más elevadas de microportador en el cultivo celular permiten cantidades totales más elevadas de células. Sin embargo, los microportadores son caros y, en estas condiciones, puede tener lugar una pérdida celular debido a que las capas celulares se desprenden de las perlas por el esfuerzo de cizalla que aparece en el sistema. Esto implica que, para producciones virales más elevadas, es necesario un mayor volumen de cultivo celular en los microportadores, sin
30 embargo, esto aumenta los esfuerzos que se deben realizar para procesar y purificar dichos grandes volúmenes.

En cuanto a la propagación viral, es importante alcanzar una densidad celular óptima para obtener la máxima producción viral. También es importante permitir la adsorción eficaz del virus en las células. Por tanto, en los métodos convencionales, el volumen del medio de cultivo se reduce antes de la infección para permitir la adsorción del virus en las células en un volumen mínimo de cultivo y para obtener una mejor relación entre el virus y las células. Sin embargo, para obtener una propagación óptima del virus, el volumen del medio de cultivo se incrementa de nuevo después de un tiempo de adsorción adecuado para que las células puedan mantener su viabilidad y/o desarrollo. Esto, sin embargo, aumenta el volumen del medio de cultivo que incluye las células y/o virus, lo que tiene el inconveniente de que se deben procesar grandes volúmenes para la purificación posterior del virus procedente de las células o del medio de cultivo celular.

45 En caso de una epidemia de infección viral, resulta crítico producir grandes cantidades de vacunas de forma adecuada para proporcionar varios millones de dosis de vacunas en un período de tiempo muy corto. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos seguros y eficaces para producir virus y antígenos. Además, se necesita una aproximación a la propagación viral mediante el empleo de materiales ya disponibles y que requieran una cantidad mínima de manipulaciones prolongadas, tal como el manejo de volúmenes reducidos de medio de cultivo celular, y que faciliten la purificación y el procesamiento posterior para la producción de vacunas.
50

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la producción de virus o antígenos virales en un cultivo celular de células adherentes unidas a un microportador.

También es objeto de la presente invención proporcionar un método de producción viral en un pequeño volumen de cultivo celular.
55

También es objeto de la presente invención proporcionar un cultivo celular de células adherentes que tiene una alta densidad celular en comparación con los cultivos celulares originales desarrollados hasta confluencia.

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar un cultivo celular de células adherentes unidas a un microportador y que tiene una alta densidad celular en comparación con los cultivos celulares originales desarrollados hasta confluencia, estando estas células infectadas con virus.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 De acuerdo con estos y otros objetos, la presente invención proporciona un método para la producción de virus o antígenos virales de acuerdo con la reivindicación 1. El incremento de la densidad celular en el cultivo celular se lleva a cabo mediante la concentración del cultivo celular, lo que incluye un aumento de la concentración del microportador en el cultivo celular.

15 En general, las células adherentes unidas a microportadores necesitan una relación óptima entre la concentración de microportadores y las células para alcanzar una densidad celular elevada. El incremento de la concentración de microportadores en el cultivo celular permitiría teóricamente alcanzar una densidad celular más alta por volumen de medio de cultivo. Sin embargo, debido a los efectos de cizalla, a la reducción de las fuentes de alimentación en el medio y a la tensión fisiológica de las células por el aumento de la concentración de microportadores, la concentración del soporte del sistema de cultivo celular se limita a una concentración específica (véase también Griffiths y col., 1982, más arriba).

20 El método de la invención permite que las células se desarrollen en condiciones óptimas de crecimiento, incluyendo la concentración de microportadores, alimentación y estrés fisiológico mínimos, para alcanzar la máxima densidad celular para el sistema utilizado.

25 En la presente invención, se descubre que la reducción del volumen de medio de cultivo antes o después de la infección por el virus, gracias a los cual se incrementan la densidad celular y la concentración de microportadores en la biomasa del cultivo celular, no influye en la productividad de las células. Por contraste, se descubre sorprendentemente que la producción viral obtenida por cada una de las células se puede incrementar en comparación con las células que se mantienen a la misma densidad celular que el cultivo celular confluyente original. Esto era totalmente inesperado ya que, debido al aumento de la concentración de microportadores en el cultivo celular, se esperaba una reducción de la viabilidad celular, un desprendimiento de las células de los microportadores y un estrés fisiológico debido a la mayor densidad celular y durante la producción viral

30 El método de la invención permite reducir el volumen del medio de cultivo que ha de ser procesado durante el proceso posterior de purificación viral a la vez que, simultáneamente, la productividad del virus por célula es similar o incluso aumenta en comparación con el cultivo celular original. El sistema se puede ampliar hasta un volumen de fermentador de 6.000 l, lo que convierte el proceso para la producción de virus para vacunas en más eficaz y rápido.

35 Según una realización del método, las células dependientes de anclaje se seleccionan de entre el grupo de células adherentes de VERO, BHK, CHO, RK, RK44, RK13, MRC-5, MDCK, CEF o células diploides monocapa, tal como se describe en Reuveny y col. (1985, Develop. Biol. Standard, 60:243-254) y otros bien conocidos en la técnica.

40 Las células adherentes unidas a microportador se pueden desarrollar en un medio de cultivo convencional que contenga suero. Según una realización preferente de la invención, las células se cultivan en un medio exento de suero o exento de suero y proteínas, tal como se describe en Kistner y col. (1998, Vaccine 16: 960-968), Merten y col. (1994, Cytotech. 14: 47-59), Cinati. y col. (1993, Cell Biology Internat. 17: 885-895), Kessler y col. (1999. Dev. Biol. Stand. 98: 13-21), WO 96/15231, US 6.100.061 o cualquier otro medio exento de suero o exento de suero y proteínas conocido en la técnica. Las células se cultivan preferentemente desde una ampolla a gran escala hasta una biomasa en un medio exento de suero o exento de suero y proteínas.

45 Según una realización de la invención, el cultivo de células adherentes unidas a microportador se desarrolla hasta alcanzar la confluencia y se infectan con un virus después de aumentar la densidad celular y la concentración de microportadores de la biomasa celular del cultivo celular confluyente.

50 De acuerdo con una realización de la invención, el cultivo de células adherentes unidas a microportador se desarrolla hasta alcanzar la confluencia y se infecta con un virus antes de aumentar la densidad celular y la concentración de microportadores de la biomasa confluyente. En cualquier caso, si el cultivo celular con mayor densidad celular o concentración de microportadores por volumen se infecta antes o después de la concentración del cultivo, la densidad celular y la concentración de microportadores en la biomasa se mantienen constantes durante la propagación viral y durante el proceso de producción, no volviéndose a incrementar el volumen del medio. El método empleado para aumentar la densidad celular y la concentración de microportadores en la biomasa de cultivo celular no infectado o infectado por un virus puede ser cualquier método conocido en la técnica para concentrar un cultivo celular. Esto se puede llevar a cabo por métodos tales como sedimentación, centrifugación, filtración, concentración con un dispositivo de perfusión, tal como un tamiz, que permitan la reducción del volumen de trabajo, o reuniendo 2 o más sistemas por biorreactor.

- La densidad del cultivo celular y la concentración de microportadores del cultivo celular desarrollado hasta la confluencia aumentan, siendo el aumento al menos 1,3 veces más importante que la biomasa original cultivada hasta la confluencia. La densidad celular del cultivo celular original de partida que se ha cultivado hasta la confluencia puede ser de entre aproximadamente $0,6 \times 10^6$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6$ células/ml. En este caso, la biomasa, cuya densidad celular ha aumentado en comparación con la biomasa del cultivo de partida, puede tener una densidad celular de entre al menos $0,8 \times 10^6$ y al menos $9,0 \times 10^6$ células/ml.
- La concentración de microportador en el cultivo celular de partida se encuentra preferentemente en el rango de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 7,0 g/l. La concentración de microportador después de la concentración de la biomasa confluyente se sitúa preferentemente en el rango de aproximadamente 0,65 g/l a aproximadamente 21 g/l.
- Preferentemente, el microportador utilizado según el método de la invención se selecciona de entre el grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, poliestireno, poliácridamida, gelatina, vidrio, celulosa, polietileno y plástico, así como aquellos que se describen en Miller y col. (1989, *Advances in Biochem Eng./Biotech.* 39: 73-95) y en Butler (1988, *Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology.* 3: 283-303).
- De acuerdo con el método de la invención, el virus se selecciona de entre el grupo de virus de la gripe, Virus de Ross-River, Virus de la Hepatitis A, Virus de la Vaccinia y Virus de la Vaccinia recombinante, Virus del Herpes Simple, Virus de la Encefalitis Japonesa, Virus del Nilo Occidental, Virus de la Fiebre Amarilla y virus quiméricos de los mismos, así como Rhinovirus y Reovirus. Forma parte del conocimiento de un especialista en la técnica seleccionar una célula huésped adherente y el virus susceptible a este huésped y utilizar el método de la invención para obtener un aumento de la producción viral del virus deseado.
- Forma parte del conocimiento de un especialista en la técnica seleccionar el tipo de microportador respectivo, la concentración de microportador en el cultivo de partida, las células adherentes susceptibles al virus y el medio, así como las condiciones óptimas de cultivo, tal como la concentración de oxígeno, suplementos del medio, temperatura, pH, presión, velocidad de agitación y control de la alimentación, para obtener una biomasa de cultivo celular confluyente que se pueda utilizar para obtener una biomasa celular que tenga una densidad celular y una concentración de microportadores aumentadas de acuerdo con este método. El cultivo celular con una biomasa de densidad celular incrementada se puede utilizar entonces para la propagación y producción virales eficaces. Una vez alcanzada la confluencia por el cultivo celular, el método de la invención permite obtener un cultivo celular con una mayor densidad celular y una mayor concentración de microportador incrementadas en al menos 1,3 veces a 10 veces y obtener una producción viral superior por volumen de cultivo debido i) el menor volumen de cultivo y ii) el aumento de la productividad por célula.
- El proceso de producción viral y la duración de la producción dependen del sistema empleado. La producción máxima de virus a alcanzar en el sistema respectivo se puede determinar por métodos estándar. Cuando se alcanza la producción viral máxima, el virus y/o las células que incluyen el virus se cosechan. Por tanto, el método de la invención comprende además un paso de cosecha del virus propagado y producido.
- Otro aspecto de la invención prevé un método para la producción de virus o de antígenos virales purificados, que comprende los pasos de proporcionar un cultivo de células adherentes unidas a un microportador, desarrollar el cultivo celular hasta alcanzar la confluencia, infectar el cultivo de células con un virus, donde la densidad celular en el cultivo celular se incrementa (i) antes de la infección por el virus o (ii) después de la infección por el virus, incubar dicho cultivo de células infectadas por dicho virus para su propagación; (f) cosechar el virus producido y (g) purificar dicho virus cosechado.
- Dependiendo de la naturaleza del virus empleado para la infección y propagación, el virus producido se encuentra en el sobrenadante del cultivo celular y/o se asocia a la biomasa celular. Los virus líticos, por ejemplo el virus de la gripe, lisan las células tras un tiempo apropiado después de la infección, liberándose el virus en el medio de cultivo celular. El virus producido y liberado en el medio de cultivo celular se puede separar de la biomasa celular o de otros fragmentos celulares por métodos convencionales, tales como centrifugación, incluyendo ultracentrifugación, centrifugación en gradiente de densidad, microfiltración, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, etc., y se purifica.
- Los virus no líticos se propagan dentro de las células y siguen asociados a las células de la biomasa. Estos virus se pueden cosechar recogiendo la biomasa, lisando las células por métodos convencionales, tales como tratamiento de las células con un detergente, calor, congelación/descongelación, sonicación, prensa francesa u otros métodos de lisado celular. Los virus liberados de las células se cosechan, se concentran y se purifican. La purificación del virus se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico o centrifugación isopícnica, etc.
- El virus de la gripe se puede propagar en líneas celulares, incluyendo las células más eficaces MDCK, así como en la línea celular cuyo uso ha sido concedido para la fabricación de vacunas humanas, células Vero. Ya se ha descrito la producción a gran escala del virus de la gripe, en un medio exento de suero o en un medio exento de suero y proteínas, en un cultivo celular de mamífero, en perlas microportadoras, en un biorreactor, así como el desarrollo de

una vacuna contra el virus de la gripe (Merten y col., 1999, Dev. Biol. Stand. 98: 23-37; Kistner y col., 1998. Vaccine 16: 960-968; Kistner y col., 1999, Dev. Biol. Stand. 98: 101-110 y WO 96/15231).

De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona un método para la producción del virus de la gripe que comprende los pasos de: proporcionar un cultivo de células adherentes unidas a un microportador, desarrollar el cultivo celular hasta alcanzar la confluencia, infectar las células con el virus de la gripe; donde la densidad celular del cultivo celular aumenta (i) antes de la infección por el virus o (ii) después de la infección por el virus, incubar el cultivo de células infectadas por dicho virus de la gripe para su propagación. Las células infectadas por el virus de la gripe pueden ser células VERO o MDCK o cualquier célula que sea susceptible al virus de la gripe. Según una realización preferente de la invención, se utilizan células VERO y se infectan con el virus de la gripe. Según una realización preferente, las células VERO se cultivan en un medio exento de suero o en un medio exento de suero y proteínas, desde la ampolla original hasta la biomasa. Las células VERO unidas al microportador se cultivan en el medio respectivo hasta alcanzar la confluencia, y la densidad celular así como la concentración de microportadores aumentan al menos 1,3 veces. Las células se pueden infectar con el virus gripe antes o después del aumento de la densidad celular en el volumen de cultivo. Después de la incubación de la biomasa infectada de alta densidad celular y la producción viral, se cosecha el virus de la gripe o el antígeno del virus de la gripe producido. El virus cosechado se purifica a continuación por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Kistner y col., 1998 (más arriba) o US 6.048.537.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una biomasa de cultivo celular de células adherentes unidas a un microportador que tiene una alta densidad celular, donde la densidad celular de la biomasa de las células en el cultivo es al menos 1,3 veces la de un cultivo celular que se ha desarrollado hasta confluencia. El cultivo de células adherentes unidas a un microportador consiste en células seleccionadas de entre el grupo de células dependientes de anclaje VERO, BHK, CHO, RK, RK44, RK13, MRC-5, MDCK, CEF o células diploides monocapa. La biomasa de cultivo celular con alta densidad celular es preferentemente un cultivo de células de VERO.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, la biomasa de cultivo celular crece en un medio libre de suero y que no incluye ninguna sustancia o agente derivado de suero. De acuerdo con otra realización preferente, la biomasa está libre de suero y proteínas y no incluye ninguna sustancia derivada de suero o proteínas añadida al medio. Preferentemente, las células se han desarrollado en un medio libre de suero o en un medio libre de suero y proteína a partir de la ampolla original de la biomasa. La biomasa de alta densidad celular se mantiene en un medio libre de suero o libre de proteína durante el proceso de producción y propagación viral.

De acuerdo con otra realización de la invención, las células de la biomasa que tiene una mayor densidad en comparación con el cultivo celular que ha crecido hasta confluencia están infectadas con un virus. La densidad celular y el volumen del medio de cultivo de la biomasa de alta densidad celular infectada con el virus se mantienen durante el proceso de propagación.

Otro aspecto de la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de células VERO unidas a un microportador, siendo la biomasa y la densidad celular de las células VERO en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces las correspondientes a un cultivo celular de VERO que se ha desarrollado hasta confluencia. El cultivo celular también tiene una concentración de microportador más alta en comparación con las células desarrolladas hasta confluencia.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, la biomasa de cultivo celular con una mayor densidad es una biomasa de células de VERO. Preferentemente, las células crecen en un medio libre de suero y la biomasa está libre de suero. De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la biomasa de cultivo está libre de suero y proteínas

Otro aspecto de la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de un cultivo celular de células adherentes unidas a un microportador infectado con un virus, siendo la biomasa de células infectadas en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces aquella de un cultivo celular que ha crecido hasta confluencia antes de la infección y que tiene una alta densidad celular. Según una realización, la biomasa de cultivo celular de células está libre de suero. De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la biomasa de cultivo celular de células está libre de suero y proteínas. Preferentemente, las células son células VERO. Esta densidad celular de la biomasa de alta densidad celular infectada con virus no disminuye durante el proceso de propagación viral.

Otro aspecto de la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de células VERO unidas a un microportador y que tiene una alta densidad celular enlazada a un microportador, siendo la biomasa de células VERO en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces la de un cultivo celular de VERO que ha crecido hasta confluencia, donde las células VERO están infectadas con un virus. Las células VERO están infectadas con un virus seleccionado del grupo de virus de la gripe, Virus de Ross-River, Virus de la Hepatitis A, Virus de la Vaccinia y derivados recombinantes del mismo, Virus del Herpes Simple, Virus de la Encefalitis Japonesa, Virus del Nilo Occidental, Virus de la Fiebre Amarilla y virus quiméricos de los mismos, así como Rhinovirus y Reovirus.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de células VERO unidas a un microportador y que tiene una alta densidad celular, donde dichas células están infectadas con un virus de la gripe,

siendo la biomasa de células VERO en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces la de un cultivo celular de VERO que ha crecido hasta confluencia.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de células VERO unidas a un microportador y que tiene una alta densidad celular, donde dichas células están infectadas con un virus de Ross River, siendo la biomasa de células VERO en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces la de un cultivo celular de VERO que ha crecido hasta confluencia.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una biomasa de cultivo celular de células VERO unidas a un microportador y que tiene una alta densidad celular, donde dichas células están infectadas con un virus de la Hepatitis A, siendo la biomasa de células VERO en dicho cultivo celular al menos 1,3 veces la de un cultivo celular de VERO que ha crecido hasta confluencia.

Habiendo sido descrita en general esta invención, a continuación se entenderá la misma con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan con el único propósito de la ilustración y no pretenden ser limitativos, salvo que se especifique de otro modo.

Ejemplo 1: Producción de antígenos virales en una biomasa concentrada de células VERO

a) Desarrollo del cultivo celular

Se utilizó como línea celular de producción células VERO (Mono Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*, riñón). Las células se obtuvieron de la Colección de Cultivos Celulares de Tipo Americano, Rockville, Maryland con número de acceso 124, bajo la designación ATCC CCL 81. Las células se adaptaron para desarrollarse en un medio exento de suero o exento de suero y proteínas tal como se describe en Kistner y col., 1998 (más arriba), la WO 96/15231 o la US 6.100.061. Para el desarrollo en un medio exento de suero, se utiliza un medio basal DMEM de HAM F12 suplementado con sales inorgánicas, aminoácidos, bicarbonato de sodio (2 g/l) y levadura o extracto de soja (0,1 a 10 g/l). Se preparó el banco de células de trabajo sin utilizar ningún componente del medio derivado animal.

Las células del banco de células de trabajo se desarrollaron en matraces-T y botellas rodantes con una relación de división de 1:6 ó 1:8. Se realizó otra propagación de las células en un biorreactor con tanque de 100 l bajo agitación utilizando un microportador Cytodex® como sustrato de sujeción. Las células se desarrollaron a 37°C durante 6-8 días. Las condiciones del cultivo fueron: una saturación de oxígeno del 20% ± 10% y un pH de 7,25 ± 0,35, que se mantuvieron constantes. Al final de la producción de biomasa, cuando las células alcanzaron el crecimiento de confluencia, una parte del volumen del reactor de biomasa se concentró en dos veces por sedimentación y se determinó la densidad celular del cultivo celular concentrado y no concentrado.

b) Determinación de la densidad celular de la biomasa

El número de células en la biomasa del cultivo celular al final de la producción de biomasa se determinó por tripsinización de las células y su recuento se llevó a cabo con un contador celular CASY® (método A), tal como se describe en Schärfe y col. (1988, Biotechnologie in LaborPraxis 10: 1096-1103) o con ácido cítrico y tratamiento con cristal violeta, seguido de recuento con un hemocitómetro (método B) tal como se describe en Sanford y col. (1951, J. Natl. Cancer Inst. 11: 773-795). La densidad celular y la concentración de portadores para las células Vero al final de la producción de biomasa y después de la concentración de la biomasa confluyente (antes de la infección) se calculó por los métodos A y B. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Determinación del número de células en un cultivo celular confluyente al final de la producción de biomasa y después de la concentración del cultivo celular confluyente

	Producción de Biomasa	Biomasa Concentrada
Concentración de Microportadores (g/l)	5,0	10,0
Densidad Celular (células / ml) (Método A)	4,6 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁶
Densidad Celular (células / ml) (Método B)	5,6 x 10 ⁶	11,2 x 10 ⁶

Ejemplo 2: Comparación de la producción de antígeno viral en una biomasa confluyente con una biomasa confluyente concentrada

Células Vero con el número de acceso definido se descongelaron del nitrógeno líquido y se pasaron a botellas de Roux y botellas rodantes con el fin de producir suficientes células para inocular un biorreactor de 1,5 litros. Tras alcanzar la confluencia, con una densidad celular final de 1,5 x 10⁶ células/ml, se sometieron las células a

tripsinización y se trasladaron a un biorreactor de 10 litros. Esto, a su vez, se utilizó como inóculo para un biorreactor de 100 litros que tenía una concentración de microportadores de 1,5 g/l. Partiendo de una ampolla del banco celular de trabajo que contiene 10^7 células, eran necesarias aproximadamente 30 generaciones para alcanzar la biomasa confluyente final de células Vero. Se desarrolló el cultivo para alcanzar la confluencia con una densidad celular final de $1,9 \times 10^6$ /ml. Antes de la infección por el virus, se cargaron dos sistemas biorreactores de 10 litros con la biomasa del cultivo celular con distintos números de células totales. El fermentador A se cargó con $1,9 \times 10^{10}$ células y el fermentador B se cargó con un número de células totales de $3,8 \times 10^{10}$. Con el fin de conseguir una mayor concentración de biomasa y portadores para cargar el fermentador B, el cultivo celular desarrollado hasta alcanzar la confluencia se concentró, por sedimentación de la biomasa, hasta alcanzar una concentración del doble. El fermentador A contenía un 100% y el fermentador B un 200% de biomasa celular del cultivo celular original desarrollado hasta alcanzar la confluencia.

a) Producción del virus de la Gripe

El cultivo celular de los fermentadores A y B se infectó con la cepa H3N2 A/Sydney/5/97 del virus de la gripe con una MOI (Multiplicidad de Infección) de 0,01. Se aplicaron parámetros de proceso idénticos de 32°C, pO₂ del 20% y pH de 7,1. Para activar el virus de la gripe para la propagación viral, se añadió una proteasa, tal como tripsina, pronasa o una parte análoga a la tripsina de la misma.

Se determinó la productividad de antígeno viral de los dos cultivos celulares diferentes de los fermentadores A y B que contenían distintas concentraciones de biomasa y se comparó en base a virus de la gripe titulado (HAU/ml) y el contenido en antígeno (antígeno purificado en gradiente de densidad). La zona pico corresponde a la concentración total de antígeno al final del ciclo lítico al tercer día después de la infección. Se muestran los datos en la Tabla 2.

Tabla 2 Determinación del título del Virus de la Gripe y del antígeno en un cultivo confluyente de células VERO y una biomasa confluyente concentrada de células VERO

Fermentador	A	B
Concentración de Portadores (g/l)	1,5 g/l	3,0 g/l
Densidad celular (células / ml) (Método B)	$1,90 \times 10^6$	$3,80 \times 10^6$
HAU / ml	640	2560
Zona Pico (rel. Unidades)	83,3 (100%)	412,3 (495%)

b) Producción del Virus de Ross-River

Se propagaron las células VERO tal como se describe anteriormente hasta alcanzar la confluencia, con una densidad final de $1,6 \times 10^6$ células/ml. Antes de la infección viral, se cargaron dos sistemas biorreactores de 50 l con la biomasa de cultivo celular que tenía distintos números de células totales. El fermentador A se cargó con $1,6 \times 10^6$ células/ml y el fermentador B se cargó con $2,3 \times 10^6$ células/ml, que representa una concentración de 1,5 veces la de la biomasa del cultivo celular confluyente. Los fermentadores A y B se infectaron con el Virus de Ross-River y se determinó la productividad de antígeno viral de los fermentadores A y B tal como se ha descrito anteriormente. La Tabla 3 muestra los resultados de la producción viral obtenida mediante el uso de distintas concentraciones de biomasa para la propagación viral.

Tabla 3 Determinación del título del Virus de Ross-River y de la producción de antígeno

Fermentador	A	B
Concentración de Portadores (g/l)	1,5	2,25
Densidad celular ($\times 10^6$ células / ml)	1,6	2,3
Título viral (log TCID ₅₀)	8,71	8,95
Título viral pfu / 10^6 células ($\times 10^6$)	321	388
Producción (%)	100	121

Ejemplo 3: Producción de Antígeno Viral en una Biomasa Concentrada de Células RKa) Desarrollo del Cultivo Celular

5 Como líneas celulares de producción se emplearon células de riñón de conejo RK-13 o un derivado complementario de las mismas RK-D4R-44, tal como se describen en Holzer y col. (1997. J. Virol. 71: 4997-5002). Se cultivaron las células en un medio convencional que contenía un 2% de suero.

Las células del banco de células de trabajo se desarrollaron en frascos-T y botellas rodantes con una relación de división de 1:6. Se realizó otra propagación de las células en un biorreactor con tanque de 10 l bajo agitación utilizando microportadores Cytodex® (Pharmacia) como sustrato de sujeción.

b) Producción del Virus Defectuoso de la Vaccinia

10 Tras haber alcanzado las células RK-13 o RK-D4R-44 la confluencia y una densidad celular final en los biorreactores de tanque, se infectó la biomasa con el Virus de la Vaccinia WR o el Virus de la Vaccinia defectuoso vD4-ZG#2 tal como se describe en Holzer y col. (1997, más arriba) con una MOI de 0,01. Después de la infección, se cargaron dos sistemas biorreactores de 10 l con la biomasa de cultivo celular infectada, con distintos números de células totales. Se cargó el fermentador A con $1,2 \times 10^{10}$ células/ml y el fermentador B con $2,4 \times 10^{10}$ células/ml. Para
 15 conseguir concentraciones mayores de biomasa y portadores para el fermentador B, el cultivo celular infectado desarrollado hasta alcanzar la confluencia se concentró por sedimentación de la biomasa para obtener una mayor concentración. El fermentador A contenía un 100% y el fermentador B un 200% de biomasa celular del cultivo celular original desarrollado hasta alcanzar la confluencia. Se determinó la productividad de antígeno viral de los dos fermentadores A y B de diferentes cultivos celulares que contenían distintas concentraciones de biomasa por
 20 volumen de medio de células infectadas. Se resumen los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4 Determinación del título del Virus de la Vaccinia en células RK

Fermentador	A	B
Concentración de Portadores (g/l)	1,5	2,5
Densidad celular ($\times 10^6$ células / ml)	1,2	2,4
Título viral pfu / 10^6 células ($\times 10^6$)	0,8	1,3
Producción (%)	100	162

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de virus o antígenos virales que comprende los pasos de
 - (a) proporcionar un cultivo de células adherentes unidas a un microportador,
 - (b) desarrollar el cultivo celular hasta confluencia,
 - 5 (c) infectar las células con un virus y
 - (d) incubar dicho cultivo de células infectadas por dicho virus para la propagación del virus, caracterizado porque el volumen de cultivo celular desarrollado hasta confluencia del paso b) se reduce i) antes del paso c) o ii) después del paso c), de forma que la densidad celular de la biomasa y la concentración del microportador se incrementan al menos 1,3 a 10 veces a la vez que el volumen del medio no aumenta durante el paso d), y porque dicho virus se selecciona de entre el grupo de virus de la gripe, Virus de Ross-River, Virus de la Hepatitis A, Virus de la Vaccinia y derivados recombinantes del mismo, Virus del Herpes Simple, Virus de la Encefalitis Japonesa, Virus del Nilo Occidental, Virus de la Fiebre Amarilla y virus quiméricos de los mismos, así como Rhinovirus y Reovirus.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la densidad del cultivo celular desarrollado hasta alcanzar la confluencia está entre aproximadamente $0,6 \times 10^6$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6$ células/ml.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el microportador se selecciona de entre el grupo de microportadores compuesto por dextrano, colágeno, poliestireno, poliacrilamida, gelatina, vidrio, celulosa, polietileno y plástico.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la concentración de microportador en el cultivo celular del paso (a) se sitúa entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 7 g/l.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dichas células se seleccionan de entre el grupo de células adherentes de VERO, BHK, CHO, RK, RK44, RK13, MRC-5, MDCK, CEF o células diploides monocapa.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichas células unidas a un microportador se cultivan en un medio exento de suero.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dichas células unidas a un microportador se cultivan en un medio exento de suero y de proteínas.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además el paso (e) de cosecha del virus propagado.
9. Método según la reivindicación 8, que comprende además el paso (f) de purificación del virus cosechado para obtener un virus o antígeno viral purificado.
10. Método según la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque el virus producido se cosecha del sobrenadante del cultivo celular.
- 35 11. Método según la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque el virus producido se cosecha de la biomasa celular.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que además comprende el paso de procesar el virus o el antígeno viral purificado en una vacuna.
- 40 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el virus o el antígeno viral producido es virus de la gripe o antígeno del virus de la gripe.
14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque dichas células son células VERO.
15. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque dichas células son células MDCK.